

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Subgrupo de Química Farmacêutica e Fitoquímica



**Desenvolvimento de Pró-Fármacos de Triazenos Anti-Tumorais
para Aplicação em Estratégias ADEPT: Activação pela
Carboxipeptidase G2**

Verónica Teixeira Antunes Capucha

MESTRADO EM QUÍMICA FARMACÊUTICA E TERAPÊUTICA

Lisboa

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Subgrupo de Química Farmacêutica e Fitoquímica



**Desenvolvimento de Pró-Fármacos de Triazenos Anti-Tumorais
para Aplicação em Estratégias ADEPT: Activação pela
Carboxipeptidase G2**

Verónica Teixeira Antunes Capucha

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria de Jesus Perry e pela Professora
Doutora Ana Paula Francisco

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para
obtenção do grau de Mestre em Química Farmacêutica e Terapêutica

Lisboa

2010

Ao meu Pai

À minha Mãe

Agradecimentos

Ao longo da realização do trabalho que aqui apresento apercebi-me de que tal só foi possível com o apoio e o incentivo de várias pessoas. Não querendo esquecer nenhuma, a todas elas, o meu sincero agradecimento.

À Professora Doutora Maria de Jesus Perry, orientadora desta tese de mestrado, pela transmissão dos seus conhecimentos científicos, pelas críticas e sugestões, por todo o apoio e dedicação e, sobretudo, pelo constante rigor, disponibilidade e atenção.

À Professora Doutora Ana Paula Francisco, docente na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pelo apoio científico e permanente disponibilidade demonstrada ao longo do trabalho.

À Professora Doutora Maria Eduarda Mendes, docente na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, por todo o apoio e orientação, bem como pelos ensinamentos e constante disponibilidade demonstrada.

Aos meus colegas e amigos de laboratório que pela atenção mostrada permitiram ultrapassar algumas dificuldades técnicas, e não só. Quero agradecer especialmente à Rita Capela, pelo apoio, constante disponibilidade, boa disposição e amizade, dentro e fora do laboratório. À Marina Prigol, que tornou divertidas as mais longas horas de trabalho.

Aos técnicos e auxiliares de laboratório, especialmente ao Sr. Francisco, pelo seu profissionalismo em solucionar as questões relativas ao material, produtos e equipamento.

À minha mãe, ao meu pai, aos meus irmãos João Rafael e Frederico, e ao Bruno Manuel agradeço todo o apoio, directo e indirecto, compreensão e tolerância, imprescindíveis ao longo deste ano.

Às minhas queridas amigas, pelas palavras e grandes momentos de amizade, o meu muito obrigado.

Índice Geral

Índice de Figuras.....	IV
Índice de Tabelas.....	VI
Resumo	VIII
<i>Abstract</i>.....	IX
Glossário de Símbolos e Abreviaturas	X
Capítulo 1. Introdução.....	1
1.1 O Cancro	2
1.2 Os Pró-fármacos e a Quimioterapia do Cancro.....	5
1.2.1 Pró-Fármacos (PF)	5
1.2.2 Pró-Fármacos Activados por Enzimas.....	6
1.3 Terapias Envolvendo a Activação Selectiva de Pró-Fármacos	8
1.3.1 Estratégia ADEPT	8
1.3.2 Outras Estratégias que Fazem Uso de Pró-Fármacos.....	9
1.3.3 Componentes Importantes em ADEPT	13
1.3.3.1 CPG2: Eficácia Clínica	16
1.3.4 Pró-Fármacos para Aplicação em Estratégias ADEPT	19
1.4 Triazenos.....	24
1.4.1 Os Triazenos como Agentes Anti-Tumorais	24
1.4.2 Mecanismo de Acção Anti-Tumoral dos Triazenos	27
1.4.3 Estabilidade Química e Actividade Biológica dos Derivados Triazénicos	32
1.4.3.1 Derivados dos HMT	33
1.4.3.2 Derivados dos MMT	34
1.5 Âmbito da Tese	39
Capítulo 2. Síntese dos Triazenos Derivados do Ácido Glutâmico	41
2.1 Introdução.....	42

2.1.1 Activação do Triazeno.....	42
2.1.2 Protecção dos Grupos Ácido Carboxílico	43
2.2 Resultados e Discussão.....	44
2.2.1 Síntese dos Derivados 4-nitrofenilo	44
2.2.2 Síntese dos Derivados do Ácido Glutâmico Protegido	44
2.2.3 Desbloqueamento dos Grupos Ácido Carboxílico	45
2.3 Caracterização Espectroscópica	47
2.3.1 Caracterização dos Derivados 4-nitrofenilo.....	47
2.3.2 Caracterização dos Derivados com Protegidos	49
2.3.3 Caracterização dos Derivados Ácido Glutâmico.....	52
2.4 Conclusões	59
 Capítulo 3. Avaliação dos Derivados de Ácido Glutâmico como Pró-Fármacos de Triazeno.....	 60
3.1 Introdução.....	61
3.2 Hidrólise Química dos Derivados Ácido Glutâmico	61
3.2.1 Produtos de Hidrólise	61
3.2.2 Resultados e Discussão do Estudo Cinético da Hidrólise em Tampão Fosfato	62
3.3 Hidrólise dos Derivados Ácido Glutâmico em Plasma Humano.....	66
3.3.1 Hidrólise dos Derivados Ácido Glutâmico na Presença de Albumina Humana.....	69
3.3.1.1 Resultados e Discussão do Estudo Cinético da Hidrólise na presença de Albumina Humana	70
3.4 Coeficientes de Partilha Calculados	73
3.5 Hidrólise dos Derivados Ácido Glutâmico na Presença de Enzima Carboxipeptidase G2 .	76
3.5.1 Resultados e Discussão do Estudo Cinético da Hidrólise na presença de Enzima Carboxipeptidase G2	76
3.6 Conclusões	81
 Capítulo 4. Procedimento Experimental.....	 83
4.1 Equipamento	84
4.2 Cromatografia	85
4.3 Solventes.....	85
4.4 Reagentes	85
4.5 Enzimas e Substratos.....	86

4.6 Triazenos.....	86
4.6.1 Síntese dos Hidroximetiltriazenos e dos Monometiltriazenos	86
4.6.2 Síntese dos Derivados 4-nitrofenilo	86
4.6.2.1 Caracterização Estrutural dos Derivados 1- <i>aryl</i> -3-[4-nitrofeniloxycarbonil]-3-metiltriazenos.....	87
4.6.3 Síntese dos Derivados com o Grupo Boc	89
4.6.3.1 Caracterização Estrutural dos Derivados [1-(4- <i>phenyl</i>)-3-metiltriazenil]-carbamoyl-di- <i>tert</i> -butyl-L-glutamato.....	90
4.6.4. Síntese dos Derivados Ácido Glutâmico	92
4.6.4.1 Caracterização Estrutural dos Derivados Ácido [1-(4- <i>phenyl</i>)-3-metiltriazenil]-carbamoyl-L-glutâmico	93
4.7 Estudos Cinéticos	95
4.7.1 Espectroscopia de Ultra-Violeta	95
4.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Resolução.....	97
4.7.3 Estudos de Hidrólise em Plasma Humano	99
4.7.3.1 Obtenção de Plasma Humano	99
4.7.3.2 Estudos Cinéticos em Plasma	99
4.7.4 Estudos de Hidrólise em Albumina Humana.....	100
4.7.5 Estudos de Hidrólise na Presença de Enzima Carboxipeptidase G2.....	101
Referências Bibliográficas	103
Anexos.....	109

Índice de Figuras

Figura 1.1 – A importância do efeito <i>bystander</i> no planeamento de pró-fármacos.....	6
Figura 1.2 – Pró-fármacos ligados a um transportador	6
Figura 1.3 – Representação esquemática da estratégia ADEPT	9
Figura 1.4 – Diferentes abordagens da activação enzimática de pró-fármacos	10
Figura 1.5 – Representação esquemática da estratégia PDEPT	12
Figura 2.1 – Espectro de ^1H -RMN do composto 50a	48
Figura 2.2 – Espectro de ^1H -RMN do composto 52d	51
Figura 2.3 – Espectro de ^1H -RMN do composto 49c	54
Figura 3.1 – Evolução relativa das espécies na hidrólise do composto 49c , em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, seguida por HPLC a 278 nm	63
Figura 3.2 – Gráfico de Hammett dos tempos de semi-vida para a decomposição dos compostos 49 em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C contra os valores de σ_p dos respectivos substituintes	65
Figura 3.3 – Efeito da albumina humana nos tempos de semi-vida da hidrólise do composto 49b em tampão fosfato isotónico 7.4, a 37°C	72
Figura 3.4 – Correlação dos tempos de semi-vida dos compostos 49 em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, e em albumina humana, a 37°C.....	72
Figura 3.5 – Correlação da lipofilia (estimada) com os tempos de semi-vida em albumina humana, a 37°C, dos compostos 49	75
Figura 3.6 – Efeito da concentração do tampão Tris-HCl sobre os tempos de semi-vida do composto 49e	77
Figura 4.1 – Decomposição do composto 49d em tampão fosfato pH 7.4 a 37°C.....	95
Figura 4.2 – Gráfico obtido para determinação do k_{obs} da hidrólise do 49d , em tampão fosfato pH 7.4, a 25°C, utilizando os dados da tabela 4.3.....	96
Figura 4.3 – Sequência de cromatogramas de HPLC da reacção de hidrólise do substrato 49c e respectivos padrões em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C.....	98
Figura 4.4 – Gráfico utilizado na determinação do coeficiente de velocidade de hidrólise do composto 49c em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, seguida por HPLC a 278nm.....	99
Figura 4.5 – Sequência de cromatogramas de HPLC da reacção de hidrólise do substrato 49e e respectivos padrões em albumina humana, a 37°C.....	101
Figura 4.6 - Gráfico utilizado na determinação do coeficiente de velocidade de hidrólise do composto 49e em albumina humana, a 37°C, seguida por HPLC a 280nm	101

Figura 4.7 – Representação gráfica da regressão não-linear de Michaelis-Menten para determinação do K_m e do $V_{m\acute{a}x}$ resultante da hidrólise do composto **49e** na presença da CPG2, a 30°C..... 102

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Estrutura, dados biológicos, cinética enzimática e reactividade química de alguns pró-fármacos	22
Tabela 2.1 – Triazenos derivados do ácido glutâmico (49).....	42
Tabela 2.2 – Derivados 4-nitrofenilo (50)	44
Tabela 2.3 – Derivados com o grupo Boc (52).....	44
Tabela 2.4 – Dados espectroscópicos de ^1H -RMN dos derivados 4-nitrofenilo (50).....	47
Tabela 2.5 – Valores de m/z mais representativos da identificação estrutural dos derivados 4-nitrofenilo (50).....	48
Tabela 2.6 – Dados espectroscópicos de ^1H -RMN dos derivados com o grupo Boc (52)	50
Tabela 2.7 – Valores de m/z mais representativos da identificação estrutural dos derivados com o grupo Boc (52).....	52
Tabela 2.8 – Dados espectroscópicos de ^1H -RMN dos derivados ácido glutâmico (49).....	52
Tabela 2.9 – Resumo da eficácia da reacção de remoção do grupo Boc pelo TFA	53
Tabela 2.10 – Valores de m/z mais representativos da identificação estrutural dos derivados ácido glutâmico (49)	55
Tabela 3.1 – Comprimentos de onda máximos dos derivados ácido glutâmico (49) obtidos por espectroscopia de UV em tampão fosfato isotónico pH 7.4, à temperatura ambiente.....	62
Tabela 3.2 – Percentagens dos substratos (49) e respectivos produtos de reacção em diferentes tempos, obtidas por HPLC em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C.....	64
Tabela 3.3 – Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de $t_{1/2}$, obtidos por HPLC em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C, dos compostos 49	64
Tabela 3.4 – Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de $t_{1/2}$, obtidos por espectroscopia de UV em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C, dos compostos 49	66
Tabela 3.5 – Valores da altura dos picos dos compostos 49 ao longo do tempo nos ensaios cinéticos em plasma humano, a 37°C.....	68
Tabela 3.6 – Valores das alturas dos picos dos derivados ácido glutâmico (49) e respectiva amina, obtidos por HPLC na presença de albumina humana em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C	70
Tabela 3.7 – Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de $t_{1/2}$, obtidos por HPLC na presença de albumina humana em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C, dos compostos 49	71

Tabela 3.8 – Valor dos coeficientes de partição (calculados pelo programa ALOGPS 2.1) dos compostos 49	74
Tabela 3.9 – Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de $t_{1/2}$ dos derivados ácido glutâmico (49) obtidos por espectroscopia de UV na presença de CPG2 em tampão Tris-HCl (0,001M, pH 7.3), a 30°C	77
Tabela 3.10 – Valores das constantes catalíticas dos derivados ácido glutâmico (49) observadas por espectroscopia de UV na presença de CPG2 em tampão Tris-HCl (0,001 M, pH 7.3), a 30°C	78
Tabela 3.11 – Valores do parâmetro cinético K_m para os compostos de sucesso encontrados na literatura.....	79
Tabela 4.1 – Solventes de eluição e de recristalização, pontos de fusão e rendimentos de reacção para os compostos 50	87
Tabela 4.2 – Solventes de eluição e de recristalização, pontos de fusão e rendimentos de reacção para os compostos 52	90
Tabela 4.3 – Variação da absorvância ao longo do tempo na hidrólise do composto 49d em tampão fosfato; pH = 7.4; T = 25°C; λ = 270nm.....	96
Tabela 4.4 – Valores dos tempos de retenção e condições utilizadas nos ensaios de HPLC dos pró-fármacos (49) e respectivos MMT e amina em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C ...	97

Resumo

Nesta tese desenvolveram-se vários pró-fármacos de triazenos anti-tumorais. Procedeu-se à sua síntese e estudaram-se alguns aspectos da sua química, com o objectivo de avaliar a sua potencial aplicação numa estratégia ADEPT (*Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy*). Esta é uma das possíveis abordagens para o tratamento do cancro que tem como objectivo a formação de um potente agente citotóxico selectivamente no local do tumor. Os compostos sintetizados funcionam como agentes alquilantes nos quais a função efectora está mascarada por uma ligação ureia ao ácido glutâmico. Esta ligação permite a activação do triazeno por acção da enzima Carboxipeptidase G2 conjugada a um anticorpo monoclonal.

Todos os derivados foram sintetizados por reacção do monometiltriazeno activado pelo cloroformato 4-nitrofenilo com o ácido glutâmico protegido nas funções ácido carboxílico com o grupo Boc. Este grupo foi depois removido como ácido trifluoroacético e anisol.

Descreve-se o estudo cinético da hidrólise dos derivados em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C, observando-se a formação quantitativa de fármaco activo. Os compostos revelaram ser pouco estáveis. Realizaram-se também estudos de hidrólise em plasma humano e na presença de albumina humana, a 37°C, e observou-se a decomposição do pró-fármaco libertando o fármaco anti-tumoral (MMT). A capacidade dos potenciais pró-fármacos de funcionarem como substratos da CPG2 foi determinada (parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$), assim como a sua estabilidade química na presença da enzima. Os derivados revelaram elevada afinidade para a enzima CPG2, libertando rapidamente o fármaco citotóxico.

Destes estudos, concluiu-se que a influência das proteínas plasmáticas na actividade de hidrólise dos compostos **49** é o principal factor condicionante na sua aplicação como pró-fármacos anti-tumorais para aplicação numa estratégia ADEPT.

Palavras-Chave: Cancro; Triazenos; Pró-fármacos; ADEPT; CPG2

Abstract

In this thesis a series of prodrugs of antitumoral triazenes were synthesized. Some aspects of their chemistry were studied, which allowed to evaluate them as prodrugs for application in an ADEPT (Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy) strategy. This is one of the possible approaches to cancer treatment which aims to form a potent cytotoxic agent selectively at the tumor site. Prodrugs were designed by coupling the triazene moiety with the glutamic acid through a urea bond. This link allows the activation of the triazene by the enzyme Carboxypeptidase G2 conjugated to a monoclonal antibody.

The synthesis was achieved through reaction of 1-aryl-3-methyltriazenes activated by 4-nitrophenil chloroformate with glutamic acid protected at the carboxylic acid functions with Boc group. The Boc group was then removed using TFA and anisole.

Kinetic studies of hydrolysis in isotonic phosphate buffer pH 7.4 at 37°C of derivatives are reported and the formation of active drug was quantitatively verified. The compounds proved to be unstable. Studies in human plasma and in presence of human albumin at 37°C, show that the hydrolysis rate of compounds is accelerated in the presence of that plasma protein, releasing the antitumor drug (MMT). The ability of the potential prodrugs to act as substrates for CPG2 was determined (kinetic parameters K_m and $V_{m\acute{a}x}$), and the chemical stability in the presence of the enzyme was also measured. Derivatives showed high affinity for the CPG2 enzyme, quickly releasing the cytotoxic drug.

From these studies, it was concluded that the influence derivatives of plasma proteins in the hydrolysis activity of compounds **49** is the main conditioning factor in its application as anticancer prodrugs for ADEPT strategy.

Keywords: Cancer; Triazenes; Prodrugs; ADEPT; CPG2

Glossário de Símbolos e Abreviaturas

Abs	Absorvância
A.C.	Antes de Cristo
Ac	Acilo
ACN	Acetonitrilo
ADAPT	<i>Antibody-Directed Abzyme-Prodrug Therapy</i>
ADEPT	<i>Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy</i>
AIC	Derivado inactivo da DTIC
α-g	α -galactosidase
Boc	Grupo protector <i>terc</i> -butoxicarbonilo
β-G	β -Glucuronidase
β-L	β -Lactamase
c.c.d.	cromatografia em camada fina
cit.	citocromo
colab.	Colaboradores
CEA	Conjugado Enzima-Anticorpo
c.d.o.	comprimento de onda
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
cDNA	DNA complementar
Cosy	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPA	Carboxipeptidase A
CPG2	Carboxipeptidase G2
d	duplete
DMT	Dimetiltriazeno
DTIC	Dacarbazina
ESI-MS	<i>Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
FA	Fosfatase Alcalina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GDEPT	<i>Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy</i>
GPAT	<i>Gene Prodrug Activation Therapy</i>
h	hora(s)
Hz	Hertz
HMT	Hidroximetiltriazeno

HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IC₅₀	<i>Half minimal inhibitory concentration</i>
IV	Infra-Vermelho
J	Constante de acoplamento
k_{cat}	Velocidade máxima de conversão enzimática de um produto por unidade de tempo
kDa	kiloDalton
K_m	Medida de afinidade da enzima para o substrato
k_{obs}	constante de velocidade observada
Lop P	Logaritmo do coeficiente de partilha 1-octanol-água
M	Molaridade
mACs	Anticorpos Monoclonais
Me	Metilo
MDEPT	<i>Melanocyte-Directed Enzyme-Prodrug Therapy</i>
min	minutos
MMT	Monometiltriazeno
MTIC	Derivado monometil da DTIC
m/z	razão carga/massa do ião
m	múltiplo
μM	micromolar
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato, forma reduzida
nm	nanómetro
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDEPT	<i>Polymer-Directed Enzyme-Prodrug Therapy</i>
PEG	Polietilenoglicol
PF	Pró-Fármaco
p.f.	ponto de fusão
Ph	Fenilo
ppm	parte por milhão
q	quadripleto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
mRNA	RNA mensageiro
R²	Coeficiente de regressão
S_N1	Substituição Nucleofílica Unimolecular

seg	segundo
s	singuleto
TBAH	Hidrogenofosfato de Tetrabutilamónio
TLC	Cromatografia de camada fina
TMZ	Temozolomida
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
t	triplete
t_r	tempo de retenção
t_{1/2}	tempo de semi-vida
UV	Ultra-Violeta
VDEPT	<i>Virus-Directed Enzyme-Prodrug Therapy</i>
wt	<i>wild-type</i>
λ	comprimento de onda
δ	desvio químico
σ_p	constante de substituinte de Hammett
ρ	parâmetro da reacção de Hammett
η	rendimento

Capítulo 1

Introdução

1.1 O Cancro

A primeira descrição conhecida de uma doença comparável ao que é actualmente o cancro data de aproximadamente 1600 A. C. e foi encontrada num papiro egípcio¹. Desde logo, a necessidade de encontrar um tratamento eficaz contra esta doença foi uma preocupação da comunidade científica, e não só. De entre os vários obstáculos que a medicina tem de ultrapassar, o tratamento e a cura do cancro é um dos que mais se destaca. O desenvolvimento de uma terapia eficaz é o desafio desta área da saúde cujo início se revelou mais controverso e cujo progresso se tem debatido com mais dificuldades. É que, para além de existirem mais de cem tipos diferentes de cancro, o conhecimento acerca da patogénese dos tumores malignos é incompleto^{2,3}.

Apesar de se conhecer o processo neoplásico há já alguns séculos, só na última metade do século XX, com o aparecimento da medicina molecular, foi possível compreender os processos biológicos de transformação e de progressão do tumor^{2,3}. Estudar de forma aprofundada os mecanismos celulares e moleculares e as características morfológicas, fisiológicas e patológicas por detrás do desenvolvimento do cancro foi (e é) crucial e imprescindível ao aparecimento e aperfeiçoamento de novas estratégias terapêuticas. Contudo, é também ao experimentar várias abordagens terapêuticas que se torna possível compreender de forma minuciosa como funciona. Portanto, estes dois factos são consequência e, ao mesmo tempo, causa um do outro. Deste modo, a ciência na área da oncologia tem evoluído muito e assim promete continuar.

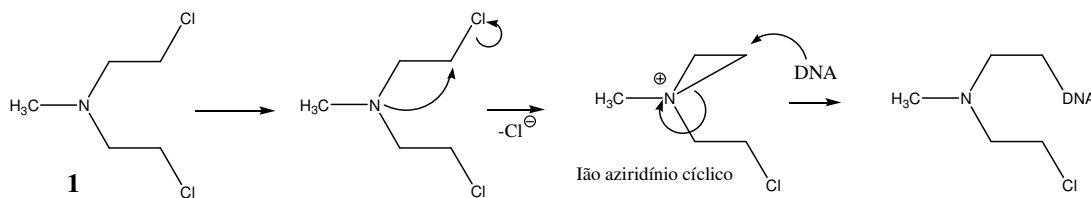
Quando ocorrem falhas nos mecanismos responsáveis pelo controlo do crescimento e da proliferação celular podem gerar-se situações de cancro. O cancro pode definir-se como uma neoplasia maligna, em que se verifica um crescimento anormal, rápido e descontrolado das células. Este fenómeno de malignidade tem por base situações como: a auto-suficiência dos factores de crescimento; a ausência de sensibilidade a factores inibitórios do crescimento; a angiogénese sustentada; ou uma falha no processo de apoptose. O processo de formação do cancro (oncogénese ou tumorigénese) resulta de uma interacção entre mecanismos genéticos e o meio ambiente. Normalmente, provém de mutações que ocorreram durante um tempo de exposição a agentes cancerígenos, como são exemplo certos produtos químicos ou raios Ultra-Violeta (UV). No entanto, também pode resultar de mutações geneticamente herdadas. De uma forma mais destrutiva, o cancro pode resultar da combinação entre mutações somáticas e mutações hereditárias. Mesmo que os danos no DNA ocorram numa única célula somática, a sua divisão transmitirá esses danos às células-filhas, originando um clone de células modificadas que pode crescer sob a forma de tumor⁴.

As células tumorais distinguem-se das células normais pela sua imortalidade, transformações morfológicas que sofrem e, por vezes, capacidade irremediável e quase sempre condenatória de metastizar. A metastização consiste na migração de células do tumor primário para novos locais, formando assim tumores secundários. São estes tumores secundários que têm, quase sempre, maior impacto na saúde do doente oncológico. O processo de metastização é um processo complexo, que consiste em vários passos, e os locais invadidos pelas metástases não são seleccionados ao acaso. As células tumorais capazes de produzir factores de crescimento e indutores do crescimento dos vasos sanguíneos são as mais vulneráveis ao processo de metastização⁴.

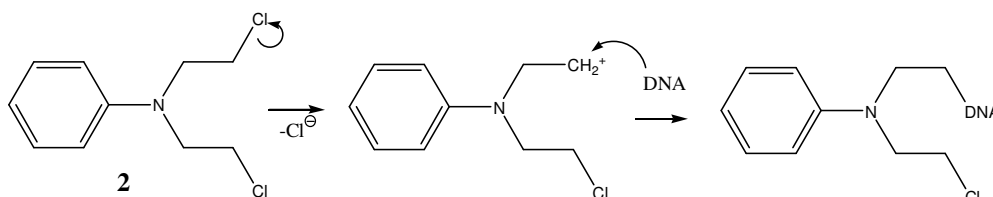
Até 1950, com a anestesia, as técnicas aperfeiçoadas e o controlo histológico, a cirurgia era o método mais eficiente no tratamento do cancro. No entanto, foi também a partir daqui que se passou a considerar o cancro como uma doença incurável. Depois de 1960, a terapia com radiações foi o tratamento disponível que se revelou mais eficaz. Mas, tanto a cirurgia como a radioterapia, são metodologias de intervenção com limitações perante o carácter invasivo das células malignas e são incapazes de controlar ou de erradicar as metástases^{1,3}.

A quimioterapia anti-neoplásica surgiu casualmente em 1940 com a descoberta da capacidade das mostardas de azoto (**1**) induzirem a regressão dos tumores. Desde a descoberta destes compostos como agentes metilantes do DNA (esquema 1.1), que as mostardas têm sido utilizadas na procura de novos e mais eficazes compostos terapêuticos. As mostardas de azoto surgiram como derivados das mostardas de enxofre e, como apresentavam um índice terapêutico aceitável em humanos, foram introduzidas na prática clínica. A citotoxicidade destes compostos estava relacionada com a sua electrofilicidade, que os tornava altamente reactivos na presença de grupos ricos em electrões, como é o caso dos fosfatos dos ácidos nucleicos. Mais tarde, por recurso à química medicinal, surgem as mostardas de azoto aromáticas alifáticas (**2**), que são introduzidas como agentes alquilantes menos tóxicos que as mostardas de azoto^{1,3,5}. O anel aromático actua como um atractor de electrões, retirando electrões ao átomo de azoto. Assim, o par de electrões do azoto é deslocalizado pela interacção com os electrões π do anel aromático e, ao contrário das mostardas alifáticas, o átomo de azoto central deixa de ser suficientemente básico para formar um ião aziridínio cíclico. Por consequência, o processo de alquilação ocorre por um mecanismo de Substituição Nucleofílica (S_N1), devido à formação de um carbocatião resultante da libertação do ião cloro (esquema 1.2). Apenas nucleófilos fortes (como a guanina) têm capacidade de reagir com estes compostos. Este processo confere, deste modo, um passo determinante da velocidade da reacção. Os análogos aromáticos destas mostardas têm a vantagem de poder ser administrados oralmente, porque, estando suficientemente

desactivados, podem alcançar os sítios alvo do DNA sem serem antes degradados por reacção com nucleófilos colaterais menos fracos que o DNA, como é o caso das proteínas^{5,6}. Contudo, como todos os métodos, tem as suas vantagens e desvantagens.



Esquema 1.1



Esquema 1.2

A maioria dos agentes quimioterápicos tem a capacidade de actuar a nível molecular, mas a capacidade de diferenciar as células normais das tumorais é, muitas vezes, reduzida, causando graves efeitos secundários. Estes efeitos são limitantes da dose a administrar e obrigam, por vezes, à interrupção do tratamento, que seria mais eficaz se fosse contínuo². A maioria dos fármacos anti-cancerígenos é utilizada numa concentração próxima da sua dose máxima tolerada, para que se possa verificar algum efeito terapêutico com significado clínico. E a terapia multi-fármacos é normalmente a modalidade aplicada no tratamento de grande parte dos cancros. Mas com uma quimioterapia tão intensiva, os efeitos secundários permanecem como o maior inconveniente dos fármacos citotóxicos e a cura só é possível num conjunto muito restrito de cancros⁷. Durante os últimos 40 anos, a procura de compostos capazes de alcançar e eliminar selectivamente as células tumorais sem causar danos nos tecidos normais tem sido bastante intensa. Existe ainda um outro problema que surge como consequência da limitação da dose e da diversidade biológica das células tumorais, que é o aparecimento de resistência aos fármacos^{8,9}. Esta tem sido também uma forte razão para intensificar a pesquisa de novos fármacos que sejam, não só mais eficazes, mas também mais aptos no uso das diferenças entre tecidos neoplásicos e tecidos normais².

1.2 Os Pró-fármacos e a Quimioterapia do Cancro

1.2.1 Pró-Fármacos (PF)

Um pró-fármaco é, por definição, um composto farmacologicamente inactivo que, após administração, é convertido num fármaco activo por uma biotransformação metabólica, pelo Citocromo P₄₅₀ (cit. P₄₅₀) por exemplo, ou por um processo de degradação química espontânea, como a hidrólise. No caso em que não há intervenção enzimática podem surgir problemas de estabilidade, pois a instabilidade é uma característica intrínseca aos compostos activados por esta via. A conversão do pró-fármaco no fármaco pode ocorrer antes, durante ou depois da absorção, ou num local específico do organismo. Idealmente, a activação do pró-fármaco deve ocorrer no local de acção desejado^{10,11,12,13}.

Os PFs podem dividir-se em dois tipos¹³:

- Pró-fármacos ligados a um transportador – possuem o fármaco activo ligado a um grupo transportador que pode ser removido enzimaticamente.
- Bioprecursores – composto que é metabolizado por modificação molecular num novo composto, que é o princípio activo ou que pode ser depois metabolizado no princípio activo.

A maioria dos fármacos clinicamente utilizados na terapia anti-cancerígena são citotoxinas. Estes compostos são agentes sistémicos anti-proliferativos que eliminam preferencialmente as células em divisão, mas não selectivamente as células tumorais. Actuando estes agentes no DNA, ao nível da sua síntese, replicação ou processamento, os tecidos proliferativos normais, como os da medula óssea e do epitélio intestinal, podem também ser afectados. Nos tumores sólidos, a maioria das células tumorais não se encontra em rápida divisão e, portanto, o seu tratamento só é possível com a administração de uma dose do fármaco suficientemente alta capaz de eliminar as células malignas. Caso contrário, não se verifica efeito terapêutico⁹. Na tentativa de aumentar a eficácia clínica e de diminuir a toxicidade sistémica, especialmente no caso de tumores sólidos de crescimento mais lento, surge a estratégia que faz uso de pró-fármacos não tóxicos que possam ser activados especificamente no tecido tumoral^{14,15}. Estes pró-fármacos devem ter uma distribuição eficiente e ser submetidos a um metabolismo celular selectivo para formar as espécies citotóxicas. Independentemente do mecanismo de activação seleccionado, só uma pequena proporção da população de células tumorais consegue activar o pró-fármaco. E, por isso, as espécies citotóxicas devem possuir uma capacidade de difusão

com distância limitada, mas suficiente para eliminar células tumorais vizinhas que perderam a capacidade de activação. Este efeito é conhecido como “*bystander effect*” e é extremamente importante no desenho dos pró-fármacos (figura 1.1)^{11,15}.

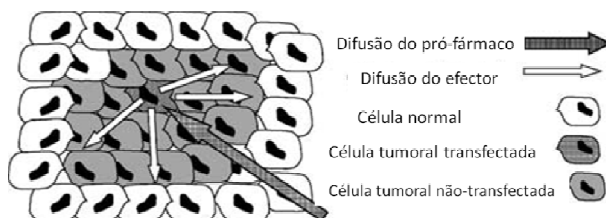


Figura 1.1 – A importância do efeito *bystander* no planeamento de pró-fármacos. Adaptado de [11].

Os pró-fármacos desenhados para serem activados num determinado tumor são normalmente pró-fármacos tripartidos, ou seja, compostos por três domínios diferentes (figura 1.2). Um deles, o activador, está sujeito a um processo de metabolismo selectivo e encontra-se ligado a um domínio ligante. A função deste último é manter o pró-fármaco desactivado até à transformação metabólica e assim que esta acontece dá-se a quebra de uma ligação num ponto pré-determinado. Esta quebra permite a libertação do domínio efector no sítio alvo. Este domínio corresponde ao fármaco e deve ter um tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) e uma difusibilidade adequadas à ligação forte a macromoléculas como o DNA e ao desempenho do efeito *bystander*. Estes são alguns dos princípios a ter em conta no desenho de pró-fármacos anti-tumorais para aplicação em estratégias terapêuticas mais selectivas^{11,12}.

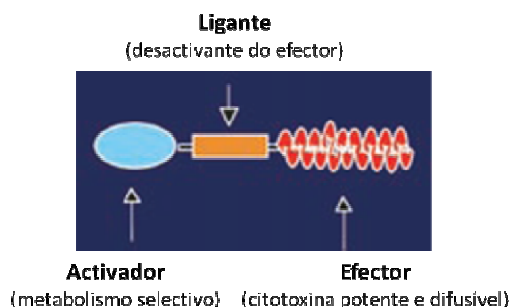
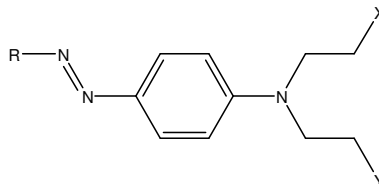


Figura 1.2 – Pró-fármacos ligados a um transportador. Adaptado de [11] e [12]

1.2.2 Pró-Fármacos Activados por Enzimas

Pouco depois do início da quimioterapia do cancro, começaram então a sintetizar-se os pró-fármacos anti-cancerígenos. Desenharam-se mostardas azo (**3**) cuja ligação química, sob determinadas condições *in vivo*, era clivada por enzimas endógenas. Os agentes citotóxicos

resultantes da clivagem enzimática apresentavam uma potente actividade alquilante. Com base neste princípio, seguiu-se a síntese de outro tipo de compostos que pudessem ser activados por espécies de enzimas que se acreditava estarem presentes em maior quantidade nos tecidos cancerígenos do que nos tecidos normais. No entanto, verificou-se que nos cancros humanos não existia uma distribuição favorável destas enzimas activadoras e, por isso, era difícil que os pró-fármacos alcançassem a toxicidade selectiva que se esperava^{15,16}.

**3**

Porém, algumas macromoléculas vistas como determinantes antigénicos dos tumores demonstravam uma distribuição mais consistente e, por isso, mais explorável como forma de obter selectividade. Estes antigénios, quando expressos na membrana celular do tumor ou secretados no fluido extra-celular tumoral, funcionam como alvos dos anticorpos. Assim, podiam ligar-se anticorpos monoclonais (mACs) com acção anti-tumoral aos antigénios associados ao tumor. Como a maioria destes anticorpos apresentava baixa actividade terapêutica, a alternativa era ligá-los a fármacos, toxinas ou isótopos radioactivos, passando os anticorpos a funcionar como transportadores até um local específico de acção do agente anti-tumoral^{7,16,17}. Apesar de se terem verificado alguns casos de sucesso, esta abordagem apresentava diversas limitações. Uma delas é a heterogeneidade da distribuição dos antigénios, que impede a internalização do conjugado antigénio-anticorpo em células que não expressam o antigénio. A dose de fármaco que se liberta está limitada ao número de moléculas do mesmo por molécula de anticorpo. Outro dos problemas é a distribuição do conjugado, devido ao seu tamanho e à fraca vascularização de alguns tumores, que faz com que a proporção de fármaco dentro das células seja pequena^{10,16,17,18}. Com o objectivo de contornar alguns destes problemas, pesquisaram-se estratégias de libertação selectiva que diferenciasssem a distribuição dos anticorpos da libertação do fármaco¹¹.

É em 1987 que se descreve uma estratégia mais complexa que faz uso de pró-fármacos activados por conjugados enzima-anticorpo (CEA). Uma enzima que não esteja normalmente presente em células humanas e que, por isso, não tenha actividade sobre os tecidos normais, pode ser distribuída para os locais do tumor quando conjugada a um anticorpo específico para um antigénio expresso nas células tumorais. A enzima vai exercer a sua actividade sobre o pró-

fármaco apenas nos locais específicos de acção. Os mACs permanecem com a função de transportador do sistema, porque, para além de altamente específicos, são fáceis de isolar e de manipular. Este sistema, desenvolvido independentemente por Bagshawe e Senter, é conhecido como *Antibody-Directed Enzyme-Prodrug Therapy* (ADEPT)^{12,18,19}.

1.3 Terapias Envolvendo a Activação Selectiva de Pró-Fármacos

1.3.1 Estratégia ADEPT

A ADEPT é uma estratégia que se processa em dois passos (figura 1.3). Numa primeira fase, é administrado intravenosamente um conjugado de um mAC com uma enzima activadora de fármacos. O CEA liga-se preferencialmente a antigénios expressos na superfície das células tumorais ou no interstício tumoral. Consequentemente, o CEA vai fixar-se e acumular-se no sítio do tumor em que é reconhecido pelo antigénio. Depois de localizado no tumor, e para que se possa dar início ao segundo passo, é necessário aguardar algum tempo até que ocorra a remoção do CEA do sangue e dos tecidos aos quais não se ligou – *clearance*^{11,15}. De acordo com a farmacocinética do conjugado, a localização do CEA nos tumores e a sua eliminação dos tecidos onde não se ligou pode demorar de algumas horas a vários dias. É essencial à eficácia terapêutica que, durante este período de tempo, o CEA associado ao antigénio se mantenha ligado à membrana extra-celular das células tumorais em vez de ser internalizado^{1,14}. No segundo passo, um pró-fármaco não tóxico de baixo peso molecular é administrado e, já no tumor, é convertido pela enzima do conjugado a um fármaco citotóxico que se difunde através da massa tumoral. Assim, o pró-fármaco não é activado nem nos tecidos normais, nem no sangue. A activação do pró-fármaco é possível devido à presença de um bom substrato para a enzima em questão. A ideia básica deste sistema é gerar um agente citotóxico dependente da concentração nos tumores^{12,15,18,20}. O intervalo óptimo entre a administração do CEA e a administração do pró-fármaco corresponde a um compromisso entre a concentração máxima de enzima no tumor e a melhor razão de distribuição do pró-fármaco entre o tumor e os tecidos normais¹⁶.

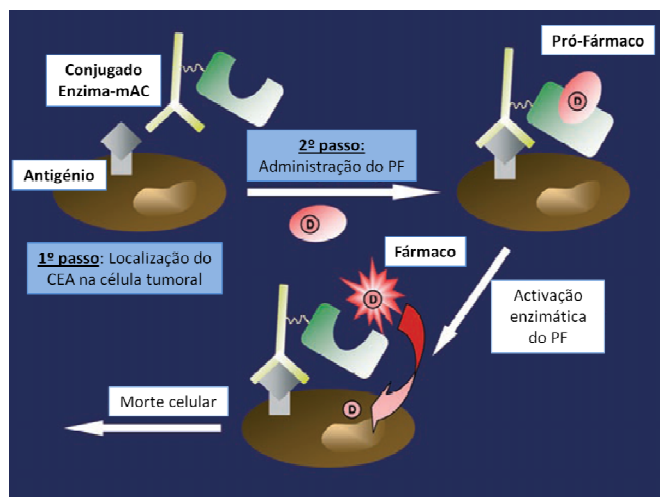


Figura 1.3 – Representação esquemática da estratégia ADEPT. Adaptado de [12] e [19]

O sistema ADEPT tem uma particularidade importante, que é o fenómeno de amplificação, ou seja, uma molécula da enzima é capaz de catalisar a conversão de muitas moléculas do pró-fármaco em fármaco activo. Esta propriedade inerente à estratégia ADEPT permite que as concentrações de fármaco no tumor sejam elevadas, quando comparadas com a injeção directa de fármacos no organismo. A localização do imunoconjugado está muitas vezes limitada a regiões bem vascularizadas, mas isso não impede que o fármaco se difunda livremente através do tumor, pois é uma pequena molécula e não se encontra ligada covalentemente ao CEA¹⁴. Daí o efeito *bystander*, característico da estratégia ADEPT, que permite o acesso do fármaco a células tumorais vizinhas que não expressem o antígeno tumoral que reconhece o CEA ou que não se ligaram a este^{2,15}.

De forma a maximizar os efeitos benéficos da estratégia ADEPT é essencial que: (i) a razão da distribuição do conjugado tecidos tumorais/tecidos normais seja elevada; (ii) a conversão do pró-fármaco no fármaco seja máxima nos locais do tumor; (iii) o fármaco activo actue localmente e não se difunda para tecidos normais²¹.

1.3.2 Outras Estratégias que Fazem Uso de Pró-Fármacos

A distribuição da enzima e do pró-fármaco nas estratégias que fazem uso de conjugados enzima-anticorpo podem ser divididos em duas grandes classes: a da distribuição da enzima directamente nos tecidos tumorais, que é o caso da ADEPT e da *Melanocyte-Directed Enzyme-Prodrug Therapy* (MDEPT) e a da distribuição de genes que codificam a enzima activadora do pró-fármaco nos tecidos tumorais. Quanto à segunda classe, é de mencionar as estratégias

Gene-Directed Enzyme-Prodrug Therapy (GDEPT) e **Virus-Directed Enzyme-Prodrug Therapy (VDEPT)** (figura 1.4)⁹.

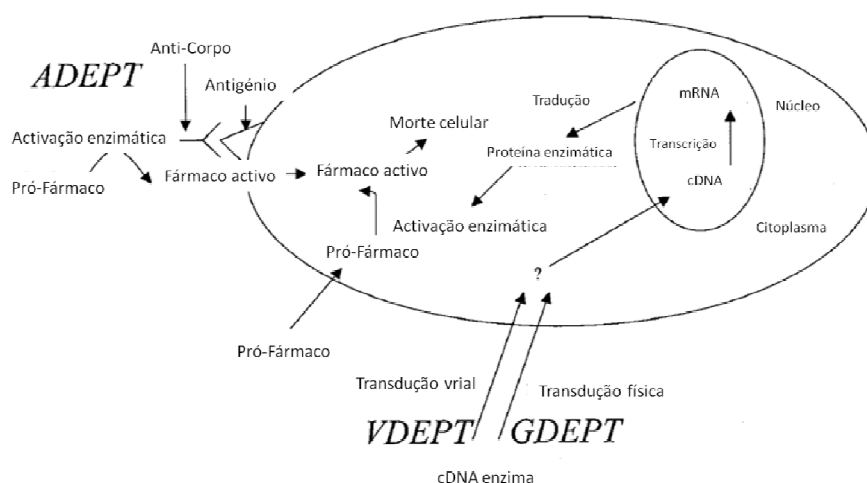


Figura 1.4 – Diferentes abordagens da activação enzimática de pró-fármacos. Adaptado de [9]

A GDEPT, também conhecida como terapia de gene suicida, consiste na distribuição física até às células tumorais de um gene que codifica uma enzima exógena. Dentro destas células, depois de ocorrer a expressão proteica, o pró-fármaco administrado sistemicamente pode ser activado. Uma vez que a enzima é produzida dentro da célula, é necessário que o pró-fármaco seja suficientemente lipofílico para entrar nas células tumorais. Embora seja feita por elementos específicos direccionados para o tumor, a libertação do gene selectivamente nas células tumorais é o maior desafio da GDEPT. Os sistemas de vectores utilizados para distribuição do gene podem ir desde lipossomas, vírus replicativos ou não replicativos a bactérias anaeróbias. Os vírus utilizados, como o retrovírus ou o adenovírus, são geneticamente modificados para que percam a sua virulência e não consigam danificar as células normais. Nesta estratégia também é essencial que exista um efeito *bystander* por parte do fármaco, tendo em conta que é bastante improvável que todas as células tumorais recebam o gene necessário para activar o pró-fármaco^{6,9,22,23,24}.

Uma das vantagens da estratégia GDEPT sobre a estratégia ADEPT é que não está limitada à utilização de enzimas que não necessitam de co-factores. Outra das vantagens prende-se com o facto de não existirem problemas de imunogenicidade relativamente a enzimas estranhas ao organismo. As enzimas são geradas directamente dentro das células tumorais, evitando respostas imunes. Apesar de aumentar a variedade de enzimas que podem ser utilizadas, esta técnica tem a desvantagem de poder perder a selectividade, uma vez que o pró-fármaco tem de ser capaz de entrar nas células livremente. Contudo, para contornar este

problema, o gene pode ser modificado para que a enzima resultante seja incorporada na membrana celular com o sítio activo exposto na superfície exterior da célula. De entre as desvantagens já mencionadas existem outras, como: a formação de anticorpos anti-DNA, a infecção local e a ulceração do nódulo tumoral^{9,23,25}.

Quando o vector utilizado é de origem viral, a estratégia recebe o nome de VDEPT. A maioria dos vectores utilizados na VDEPT é construída para que os vírus percam a capacidade de replicação. Contudo, existe sempre um ligeiro risco de reversão para a forma *wil-type* (wt) do vírus. Para além disso, os vectores retrovirais são inseridos no DNA da célula hospedeira, o que pode causar mutagénese para o genoma hospedeiro. Outro dos inconvenientes desta estratégia está associado ao facto de os vectores retrovirais terem a capacidade de se ligar exclusivamente às células em divisão. Mesmo em nódulos tumorais com crescimento acelerado, apenas 6 a 20% das células se encontram num estado de proliferação. Consequentemente, a maioria dos tumores não será sensível à morte celular mediada pela VDEPT^{9,18}.

Existe um outro método, uma variação da GDEPT, que faz uso das diferenças transcricionais entre as células normais e as células tumorais de modo a direccionar a expressão da enzima para o local dos tumores. É a **Genetic Prodrug Activation Therapy** (GPAT)^{6,9,11}.

A MDEPT surgiu como possível estratégia selectiva para o tratamento do melanoma maligno. O mecanismo de libertação selectiva do fármaco baseia-se no facto de a expressão da enzima tirosinase ser exclusiva dos melanócitos. Quando os melanócitos se tornam malignos, observa-se um aumento acentuado nos níveis desta enzima nas células tumorais e, deste modo, é possível desenvolver estratégias que façam uso de pró-fármacos cuja activação depende da sua presença. O mecanismo de libertação do fármaco está assim direccionado para o local do tumor²⁶. Esta estratégia difere de estratégias como a ADEPT pelo facto de utilizar uma enzima que é naturalmente expressa no organismo e que não necessita de ser introduzida de forma artificial, tornando-se vantajosa por isso mesmo²⁷. Ao contrário de estratégias como ADEPT e GDEPT, em que a especificidade para o local do tumor nem sempre é total, espera-se que na MDEPT o sistema de libertação do fármaco esteja altamente concentrado nas células tumorais^{28,29}.

A **Polymer-Directed Enzyme-Prodrug Therapy** (PDEPT) é uma estratégia mais recente, da mesma classe que ADEPT e MDEPT, que combina um pró-fármaco polimérico com o respectivo conjugado enzima-polímero (figura 1.5). Devido ao efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention*) podem encontrar-se elevadas concentrações de macromoléculas como a albumina, os politetilenoglicóis ou as poliacrilamidas nos tumores. Assim, conjugar fármacos a polímeros

sintéticos biocompatíveis com estas moléculas parece ser uma boa estratégia. A PDEPT utiliza macromoléculas como o polietilenoglicol (PEG) para direccionar as enzimas, de modo a melhorar a libertação exclusiva dos fármacos anti-cancerígenos nas células tumorais. A PDEPT implica que se administre primeiro o pró-fármaco polimérico, de modo a promover a sua localização no tumor, e só depois o conjugado de activação enzima-polímero. A vantagem da PDEPT sobre estratégias como a ADEPT, a GDEPT ou a VDEPT é a pouca ou nenhuma imunogenicidade que se verifica. Para além disso, a farmacocinética clínica confirmou que a eliminação do pró-fármaco a partir do plasma é rápida e que a localização específica no tumor não é afectada. Assim, existe a oportunidade de administrar o pró-fármaco primeiro contornando os problemas associados à activação antecipada do mesmo em circulação^{12,19,30}.

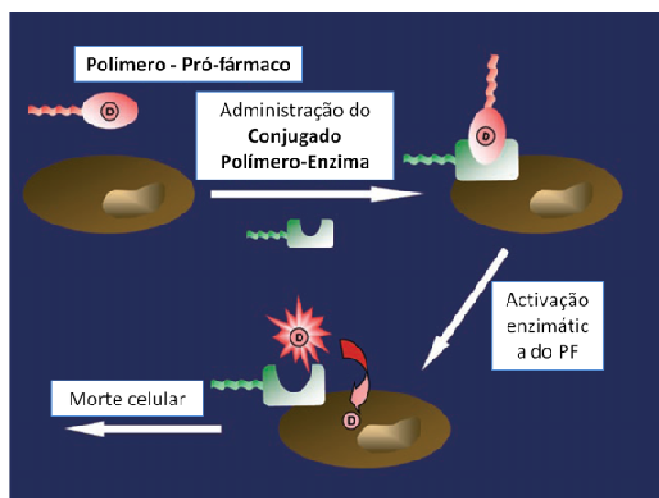


Figura 1.5 – Representação esquemática da estratégia PDEPT. Adaptado de [12]

Por último, é de mencionar a ADAPT (*Antibody-Directed Abzyme-Prodrug Therapy*), uma estratégia que utiliza *abzymes*, isto é, anticorpos com propriedades catalíticas. Deste modo, é possível desenhar pró-fármacos que actuem como antígenos para estes anticorpos e que sejam, por isso, activados pelas suas propriedades catalíticas⁶. Wentworth *et al* utilizaram um anticorpo catalítico IgG por imunização com o hapteno^{2,31}. A principal vantagem desta estratégia sobre a ADEPT está relacionada com a possibilidade de desenhar mecanismos catalíticos que não ocorrem naturalmente, permitindo uma activação altamente selectiva dos pró-fármacos nos tumores. A outra vantagem deve-se à ausência do risco de ocorrer uma reacção imune⁶. A grande desvantagem desta estratégia está relacionada com o fraco poder catalítico do anticorpo até agora alcançado, juntamente com os elevados valores de K_m . Contudo, com o desenvolvimento de novos anticorpos catalíticos capazes de cumprir a actividade das enzimas naturais, a estratégia ADAPT não deve ser negligenciada².

1.3.3 Componentes Importantes em ADEPT

A estratégia ADEPT é um sistema multi-factorial e todos os elementos que o compõem requerem um processo de optimização.

Pró-Fármaco e Fármaco em ADEPT

Em princípio, qualquer fármaco que possa ser convertido num pró-fármaco tem aplicação na estratégia ADEPT. Contudo, o pró-fármaco ideal deve^{8,15,32,33}:

- Ser muito menos citotóxico do que o seu correspondente fármaco activo;
- Ser quimicamente estável sob condições fisiológicas;
- Apresentar boas propriedades farmacológicas e farmacocinéticas;
- Ser convertido única e exclusivamente pela enzima do CEA e não por outras enzimas endógenas.

Na prática, a selecção do pró-fármaco está limitada à escolha da enzima. Assim, este deve conter um grupo funcional que possa ser utilizado para incorporar o substrato da enzima. A ligação daí resultante deve ser rapidamente clivada pela enzima de forma a originar o fármaco, ou seja, o pró-fármaco deve ser um bom substrato da enzima activadora sob condições fisiológicas. Este requisito nem sempre é fácil de alcançar, nomeadamente para enzimas altamente específicas⁴⁰.

Relativamente a um fármaco bom candidato à estratégia ADEPT, este deve ser pequeno e de baixo peso molecular e relativamente lipofílico para poder difundir através das células tumorais. Por outro lado, deve ser suficientemente reactivo (baixo $t_{1/2}$ *in vivo*) para prevenir a sua difusão do sítio do tumor para a circulação. O fármaco deve ainda apresentar citotoxicidade dependente da dose e ser capaz de escapar aos mecanismos de MDR (*MultiDrug Resistance*)^{8,15,32,33,40}.

Anticorpos em ADEPT

Os anticorpos que se ligam ao antigénio associado ao tumor garantem a localização selectiva de activação do pró-fármaco. Assim, são o componente chave da funcionalidade da estratégia ADEPT. Para evitar problemas de imunogenicidade, os anticorpos utilizados são mACs produzidos especificamente para a estratégia em causa. Existem alguns requisitos relativamente aos anticorpos dos conjugados utilizados em ADEPT^{15,32}:

- Devem localizar-se no tumor com alta afinidade;
- Devem ligar-se o mínimo possível a antigénios expressos em células normais;

- A ligação covalente do anticorpo à enzima não deve afectar a sua capacidade de ligação ao antígeno nem a actividade enzimática;
- Devem ser rapidamente eliminados da circulação.

Enzimas em ADEPT

Bem como os anticorpos, as enzimas que podem ser utilizadas na estratégia ADEPT devem respeitar alguns requisitos específicos. Tais como^{8,9,15,32,33}:

- Facilidade de obtenção;
- Tamanho e peso molecular reduzidos;
- Pureza e estabilidade químicas;
- Capacidade de catalisar a cisão da ligação covalente entre o fármaco e o substrato enzimático com elevada selectividade e sob a forma de reacção não reversível;
- Alta especificidade para o substrato;
- Baixo K_m e elevado K_{cat} para o substrato;
- Não deve ser expressa nos tecidos humanos nem induzir respostas imunogénicas;
- Não devem existir inibidores endógenos da sua actividade catalítica no local do tumor;
- As suas propriedades catalíticas devem ser diferentes das propriedades catalíticas das enzimas endógenas em circulação;
- Devem ter actividade e estabilidade óptimas sob condições fisiológicas, ou seja, a 37°C e a valores de pH próximos dos que se verificam no fluido extracelular tumoral;
- Devem ter a capacidade de activar uma vasta gama de pró-fármacos anti-cancerígenos.

Enzimas que necessitem de co-factores para realizar a sua actividade enzimática são desvantajosas para a estratégia ADEPT, a não ser que o co-factor seja de fácil e segura administração concomitantemente com a administração do pró-fármaco. Mas este passo, por vezes, pode ser limitante da formação do agente citotóxico³³.

As enzimas utilizadas em ADEPT podem dividir-se em três categorias: enzimas de origem não mamífera e sem homólogos mamíferos (classe I), enzimas de origem não mamífera com homólogos mamíferos (classe II) e enzimas de origem mamífera (classe III)^{1,15}.

Utilizar enzimas de classe I, como a Carboxipeptidase G2 (CPG2) e a β -lactamase (β -L), entre outras, evita que ocorra a activação do pró-fármaco no sangue ou nos tecidos normais. O pró-fármaco é desenhado para ser estável, não tóxico e ser especificamente activado pela enzima do conjugado (e não por outras enzimas endógenas), evitando assim a toxicidade em

células normais. Outra vantagem em utilizar estas enzimas é que as mesmas podem ser facilmente obtidas em larga escala, uma vez que são bacterianas ou facilmente expressas em bactérias e não necessitam de modificações pós-tradução. Para além disso, a maioria apresenta bons parâmetros farmacocinéticos e não há a probabilidade de ser inibida por inibidores ou substratos de origem humana. A sua maior desvantagem é a possibilidade de desencadear respostas por parte do sistema imunitário^{1,14,15}. Enzimas como a β -Glucuronidase (β -G), de classe II, têm a vantagem de estar presentes apenas em pequenas quantidades no sangue. Uma das vantagens da β -G bacteriana sobre a β -G humana é a sua maior eficiência como catalisador. A forma bacteriana tem um pH óptimo de 6.8 comparado com o pH de 5.4 da forma humana. Na β -G humana, uma menor velocidade na transformação do substrato também a coloca em desvantagem^{1,14,15}. As enzimas de classe III, como a Carboxipeptidase A (CPA), a fosfatase alcalina (FA) ou a α -galactosidase (α -g), têm como principal vantagem o facto de apresentarem um baixo potencial para desencadear respostas imunitárias. Assim, podem ser utilizadas em vários ciclos de terapia. No entanto, estas enzimas endógenas podem activar o pró-fármaco em sítios inadequados, em vez de o activarem selectivamente no local do tumor, causando uma citotoxicidade inespecífica^{1,15}. Uma das formas de melhorar a estratégia ADEPT é utilizar formas mutantes das enzimas humanas, para evitar a toxicidade sistémica causada pela sua forma wt e para diminuir a resposta imunitária causada pela aplicação de enzimas não humanas⁹.

Conjugado Enzima-Anticorpo em ADEPT

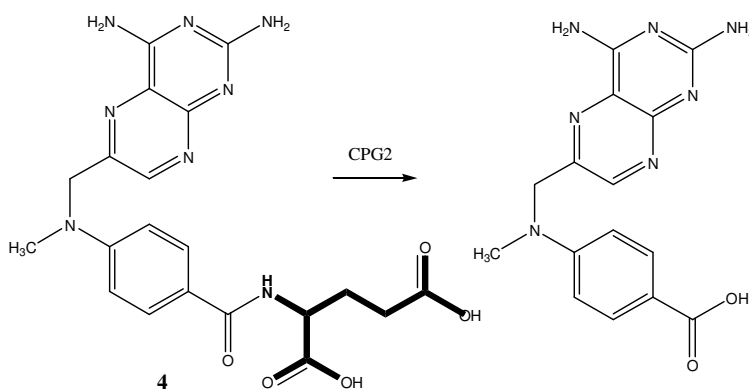
A conjugação do anticorpo à enzima pode ser feita quimicamente ou por outros meios, como a tecnologia recombinante. Para obter o conjugado por uma ligação química podem utilizar-se reagentes bifuncionais capazes de fazer a ligação entre dois péptidos. Uma outra forma de ligação envolve a utilização de anticorpos duplamente específicos, isto é, capazes de reconhecer a enzima e o antígeno expresso nas células tumorais^{8,33,34}.

A eliminação do CEA que não se liga às células tumorais tem de ocorrer antes da administração do pró-fármaco, de modo a evitar a activação indesejada do mesmo em locais remotos ao tumor. Um tempo de eliminação demasiado longo tem como consequência um aumento no tempo de exposição ao CEA, o que aumenta o risco de reacções adversas por parte do sistema imunitário. Isto pode limitar a eficácia terapêutica da estratégia, porque só se podem aplicar poucos ciclos de tratamento. Quanto mais lenta for a eliminação do conjugado do tumor, e mais rápida a eliminação dos tecidos normais e do sangue, maior é a selectividade do sistema⁸.

Deste modo, as abordagens mais modernas integram estratégias que aceleram a eliminação do imunoconjugado. Uma das ferramentas mais comum é a administração de um segundo anticorpo, que se liga ao sítio activo da enzima, inactivando a fracção da mesma que continue ainda em circulação. Outra estratégia que também encurta o tempo do conjugado em circulação é a galactosilação do segundo anticorpo, o que permite uma maior absorção no fígado mediada pelos receptores da galactose^{1,33}. A conjugação da enzima com fragmentos parciais de anticorpos em vez de anticorpos inteiros é uma outra forma de eliminar mais rapidamente o CEA da circulação. Na tentativa de melhorar a estratégia ADEPT surgiu uma nova forma de preparar um CEA, que faz uso da tecnologia do DNA recombinante para produzir uma proteína de fusão enzima-anticorpo. Esta proteína com características definidas evita passos de purificação adicionais do anticorpo que podem, por vezes, resultar na redução da actividade enzimática ou na diminuição da ligação do anticorpo ao conjugado⁹.

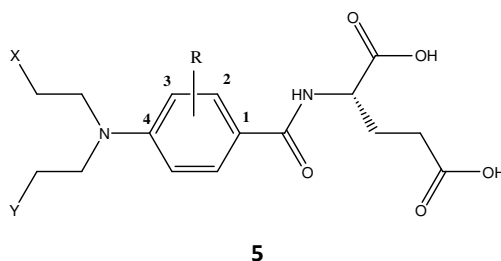
1.3.3.1 CPG2: Eficácia Clínica

A escolha da CPG2 para os primeiros ensaios ADEPT deveu-se essencialmente à sua disponibilidade. Esta enzima foi desenvolvida no *Centre for Microbiological Research at Porton Down* (CAMR) com o objectivo de degradar o metotrexato (**4**, esquema 1.3) em situações de overdose dos pacientes. Curiosamente, verificou-se que as suas propriedades respeitavam os requisitos enzimáticos da estratégia ADEPT. Uma rápida transformação de folatos glutamados por clivagem do glutamato terminal, como é o caso do metotrexato e do ácido fólico, e a ausência de homólogos mamíferos faziam da CPG2 uma potencial candidata para estudos ADEPT. A CPG2 foi então uma das primeiras enzimas descritas que podem ser utilizadas na activação selectiva de pró-fármacos¹⁸. Esta enzima bacteriana (proveniente de *Pseudomonas* sp.) é uma metaloprotease de zinco que cliva especificamente o ácido glutâmico terminal^{33,35,36}.



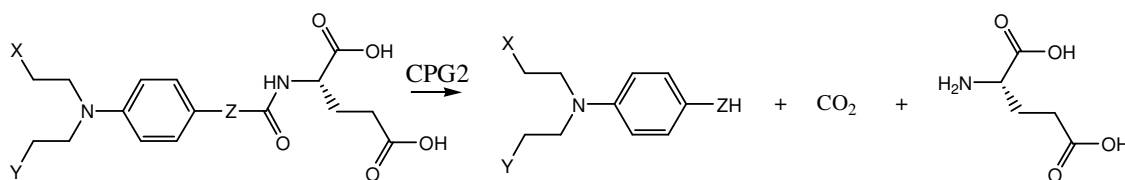
Esquema 1.3

Na maioria dos estudos realizados, a CPG2 foi acoplada quimicamente a fragmentos $F(ab')_2$ de um anticorpo e usada para activar derivados de ácido glutâmico de várias mostardas de azoto^{2,12,14,21}. Para que estas mostardas pudessem ser activadas pela CPG2, introduziram-se ligações amida no substrato da enzima, sendo um dos requisitos essenciais que esta funcionalidade se encontre entre um anel aromático e a função ácido glutâmico (**5**). Uma das vantagens deste sistema é que, devido à presença de dois grupos funcionais acídicos, a entrada do pró-fármaco através das membranas das células tumorais é minimizada, em comparação com o que acontece com o fármaco, que é muito mais lipofílico¹⁵.



Num modelo de carcinoma subcutâneo de rato observou-se uma potente actividade anti-tumoral em ratinhos que receberam o CEA seguido do pró-fármaco (derivados **5**) sob diferentes regimes de tratamento. O melhor de todos resultou mesmo na erradicação do tumor e tal foi possível quando se administraram doses de pró-fármaco de 3 x 10 mg por rato, 72 horas depois de 50 unidades de enzima do CEA terem sido injectadas³⁷. A determinação dos níveis de enzima, de pró-fármaco e de fármaco no tumor e nos tecidos normais mostrou que era nos tecidos tumorais que a razão fármaco activo/pró-fármaco era maior, indicando que a activação foi específica neste local. Contudo, também se verificou que havia uma quantidade significativamente elevada de fármaco activo no fígado, nos rins e no sangue, ou seja, o pró-fármaco estava a ser activado noutros locais e não só no sítio do tumor. Para ultrapassar este obstáculo utilizou-se um anticorpo anti-enzima galactosilado^{38,39}. Assim, foi possível administrar o pró-fármaco mais cedo, com um prazo de aproximadamente 24 horas, com resultados igualmente benéficos³⁵.

Actualmente, a CPG2 integra a estratégia ADEPT para activação de uma grande variedade de pró-fármacos. Esta enzima tem a capacidade de clivar ligações que se localizem entre o domínio L-glutâmico e um núcleo aromático não só do tipo amida, mas também dos tipos ureia ($Z = NH$) e carbamato ($Z = O$) (esquema 1.4)¹⁵.



Esquema 1.4

A CPG2 é uma das enzimas que foi também estudada para aplicação em estratégias GDEPT. Em GDEPT, o gene que codifica a enzima é direccionado para o tumor e a sua expressão em apenas uma fracção das células tumorais será suficiente para eliminar as células na vizinhança pelo efeito *bystander*³³.

Quando comparada com a quimioterapia convencional, a estratégia ADEPT apresenta várias vantagens^{8,15,20}:

- Há uma maior selectividade para as células tumorais e o intervalo entre a administração do CEA e a administração do pró-fármaco dá tempo para que o conjugado se localize especificamente no tumor enquanto ocorre a *clearance* nos outros tecidos;
- Não é necessária a internalização do CEA nas células tumorais;
- Verifica-se um efeito de amplificação e um efeito *bystander*, o que permite a introdução de doses de CEA relativamente baixas e não exige que os antígenos estejam presentes em quantidades elevadas nem em todas as células;
- O fármaco activo libertado no tumor é de baixo peso molecular e é capaz de se difundir rapidamente;
- O conceito por detrás da estratégia tem aplicação clínica;
- A concentração de fármaco activo libertado no tumor é superior quando comparada com a resultante da injeção directa do fármaco;
- É possível a utilização de enzimas não humanas.

Quanto às desvantagens associadas a esta técnica e algumas soluções para ultrapassá-las é de referir^{8,15,20,32}:

- A imunogenicidade do CEA, que pode ser resolvida com proteínas de fusão de anticorpos humanizados com enzimas de mamíferos ou com a administração de imunossuppressores;

- A perda de especificidade ou a heterogeneidade dos conjugados (devido à utilização de enzimas humanas);
- O fraco acesso às células tumorais devido a CEA de grandes dimensões ou, em casos de fraca vascularização do tumor, o escasso transporte do CEA até ao local de acção;
- A desintegração do CEA *in vivo*;
- A inibição da localização dos conjugados no tumor pela presença de antígenos em circulação ou a ausência de antígenos específicos nas células tumorais;
- Ocasionalmente, atravessar a membrana celular pode revelar-se um problema para os fármacos;
- A probabilidade de eliminar células normais por libertação do fármaco activo formado no tumor. Contudo, o desenho de fármacos activos com pequenos tempos de semi-vida pode prevenir que tal ocorra;
- A complexidade de sistemas de duas ou três etapas (se for usado um agente de *clearance*);
- O custo e as dificuldades associadas ao desenvolvimento e à purificação de anticorpos.

1.3.4 Pró-Fármacos para Aplicação em Estratégias ADEPT

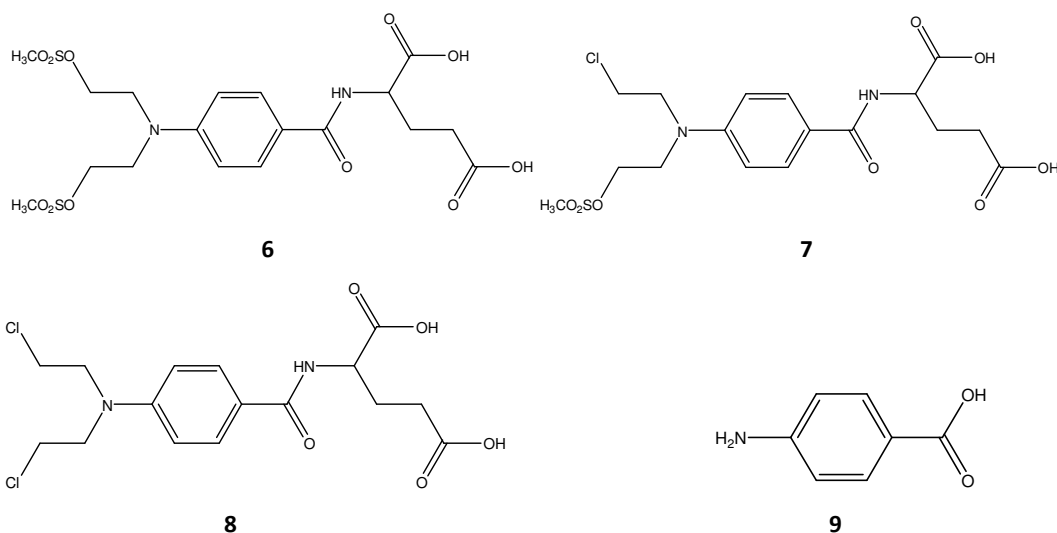
A maioria das estratégias ADEPT utiliza pró-fármacos que derivam de agentes alquilantes e que podem ser activados por uma grande variedade de enzimas (CPG2, β -L, β -G, etc.). Os agentes alquilantes são compostos altamente electrofílicos que reagem com nucleófilos (como o DNA), formando fortes ligações covalentes. Compostos que contenham dois grupos alquilantes são capazes de se localizar entre as duas cadeias de DNA, impedindo assim a replicação ou a transcrição. Alternativamente, o composto pode ligar-se à mesma cadeia em dois locais diferentes, mascarando de tal forma essa porção da hélice que as enzimas necessárias à função do DNA não lhe conseguem aceder. Existe um outro processo responsável por uma alteração na sequência de aminoácidos da proteína que leva à ruptura da estrutura e da função de proteínas essenciais à sobrevivência da célula tumoral⁶. Existem várias razões que justificam o uso dos agentes alquilantes como pró-fármacos^{15,40}:

- São compostos sinteticamente acessíveis;
- Os fármacos activos libertados demonstram actividade independente do ciclo celular;
- Estes fármacos são também dependentes da dose e efectivos contra as células quiescentes;
- Os fármacos activos libertados induzem menos resistência do que os agentes quimioterápicos convencionais;

- A desactivação química dos agentes alquilantes é possível pela utilização de grupos funcionais que são posteriormente clivados pelas enzimas apropriadas;
- É possível obter fármacos cuja reactividade química é 100 vezes superior à do pró-fármaco;
- Os pró-fármacos têm sido desenhados de forma a libertarem o fármaco activo com um tempo de semi-vida bastante curto.

Durante a evolução do uso clínico de agentes citotóxicos na quimioterapia convencional, a escolha dos mesmos tem sido feita de acordo com a sua capacidade em demonstrar não só citotoxicidade, mas também selectividade. No entanto, quando se recorre a um sistema de distribuição selectiva, este requer apenas que o fármaco activo seja muito mais citotóxico que o pró-fármaco que lhe deu origem. Isto é, a selectividade exigida não está conferida propriamente ao fármaco utilizado, mas sim à estratégia adoptada. Os agentes alquilantes, para além das razões já mencionadas, difundem-se bem através dos tecidos, são igualmente tóxicos perante células bem oxigenadas ou células em hipóxia e normalmente não demonstram resistência cruzada, de modo que em concentrações suficientemente altas têm a capacidade de ser letais para todas as células. Assim, os fármacos candidatos à realização dos primeiros estudos ADEPT pertencem à categoria dos agentes alquilantes, apesar de outras classes de agentes citotóxicos poderem ser também preparados sob a forma de pró-fármacos⁴¹. Para além disso, os primeiros fármacos (de agentes não alquilantes) a serem desenvolvidos para aplicação na estratégia ADEPT apresentavam longos tempos de semi-vida, o que era desvantajoso devido à diminuição da eficácia de uma distribuição selectiva. Com o desenvolvimento de agentes alquilantes com tempos de semi-vida biológicos de apenas alguns segundos, foi possível ultrapassar esse problema, aumentando assim o efeito de selectividade⁴¹.

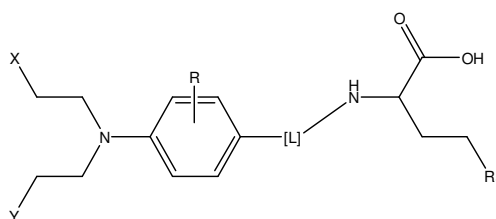
No início do desenvolvimento da estratégia ADEPT, identificada a CPG2 como uma enzima que, conjugada a um anticorpo, era capaz de se localizar nas células tumorais retendo a sua actividade catalítica, o passo a seguir era identificar um agente alquilante que pudesse ser convertido num pró-fármaco relativamente inerte por adição de um grupo prostético glutamato⁴¹. Isto levou à síntese de pró-fármacos (derivados do composto **5**) como o ácido 4-[bis[2-(mesiloxi)etil]amino]benzoil-L-glutâmico (**6**), o ácido 4-[(2-cloroetil)[2-(mesiloxi)etil]-amino]benzoil-L-glutâmico (**7**) e o ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzoil-L-glutâmico (**8**)^{15,41,42}. Cada um destes é um agente alquilante bifuncional, cujo efeito de activação da função carboxílica está mascarado pela junção da metade correspondente ao ácido benzóico à metade do resíduo de ácido glutâmico, através de uma ligação amida⁴².



O raciocínio aplicado na síntese desta série de amidas L-glutamil de mostardas de azoto derivadas do ácido 4-aminobenzóico (**9**) está relacionado com a função ácida da molécula. A pH fisiológico o grupo carboxílico do fármaco activo está ionizado, o que resulta num efeito electrodador capaz de activar o grupo mostarda, que é o responsável pela capacidade de alquilação do DNA¹⁵. A mostarda bis-cloro ($t_{1/2} = 5,4$ h), por exemplo, era cerca de cem vezes mais citotóxica do que o seu pró-fármaco glutamado (**8**) e, na ausência de enzima, a hidrólise do pró-fármaco no fármaco era muito lenta, mas na sua presença, esta conversão era rapidamente efectuada. Comparando esta série de três diferentes funcionalidades de mostardas, verificou-se que a maior razão entre o tempo de semi-vida do pró-fármaco e o tempo de semi-vida do respectivo fármaco correspondia ao mono-mesil (**7**). Este pró-fármaco era também o que apresentava melhor índice terapêutico *in vivo* e era capaz de combater a quimio-resistência de células tumorais e de retardar o crescimento de tumores humanos (tabela 1.1). Relativamente ainda ao **8**, traçaram-se perfis de concentração *versus* tempo em ratinhos e observou-se que a conversão completa do pró-fármaco no fármaco acontecia apenas no local do tumor^{15,41,83}.

O fármaco activo correspondente ao mono-mesil (**7**) era, no entanto, um agente citotóxico fraco ($IC_{50} = 80 \mu M$), o que exigia a utilização de elevadas doses de pró-fármaco nos estudos terapêuticos. Mais ainda, este pró-fármaco apresentava um elevado tempo de semi-vida, o que aumentava o risco de saída do fármaco gerado no tumor para a periferia. Estas considerações levaram à procura de sistemas alternativos com base em diferentes grupos de agentes alquilantes derivados de vários ácidos benzóicos substituídos, para que a clivagem pela CPG2 desse origem a um potente fármaco citotóxico com tempos de semi-vida mais curtos^{15,21}. A realização de estudos posteriores demonstrou que as ligações carbamato e ureia

também são substratos da CPG2 (como já tinha sido referido). Dowell *et al*²¹ e Springer *et al*⁴³ sintetizaram vários pró-fármacos cujos grupos de ligação entre o agente alquilante e o ácido glutâmico terminal diferiam da convencional ligação amida (**10**). Dos resultados obtidos concluiu-se que os fármacos activos obtidos a partir dos pró-fármacos de mostardas fenólicas e anilinas (esquema 1.4) eram marcadamente mais potentes que o fármaco derivado do ácido benzóico (tabela 1.1). Verificou-se ainda que dois dos pró-fármacos fenólicos **10** (X = Y = Cl, L = O, R = H, R₁ = COOH ou tetrazole) eram 100 a 200 vezes menos potentes *in vitro* que o fármaco activo. Para além disso, o pró-fármaco tetrazole em combinação com elevadas doses de CEA apresentou a melhor actividade anti-tumoral, apesar de ser um substrato da CPG2 dez vezes pior que o seu análogo carboxílico. As outras ligações revelaram-se fracos substratos ou nem sequer eram substratos da enzima^{15,21}.

**10**


X, Y = Cl, Br, I, OSO₂CH₃
 R = H, CH₃, CH₂CH₃, CH₂CH₂CH₃, F, Cl
 R₁ = COOH,  (tetrazole)
 L = CO, OCO, NHCO, CH₂CO, SCO, OCS, CH₂CS

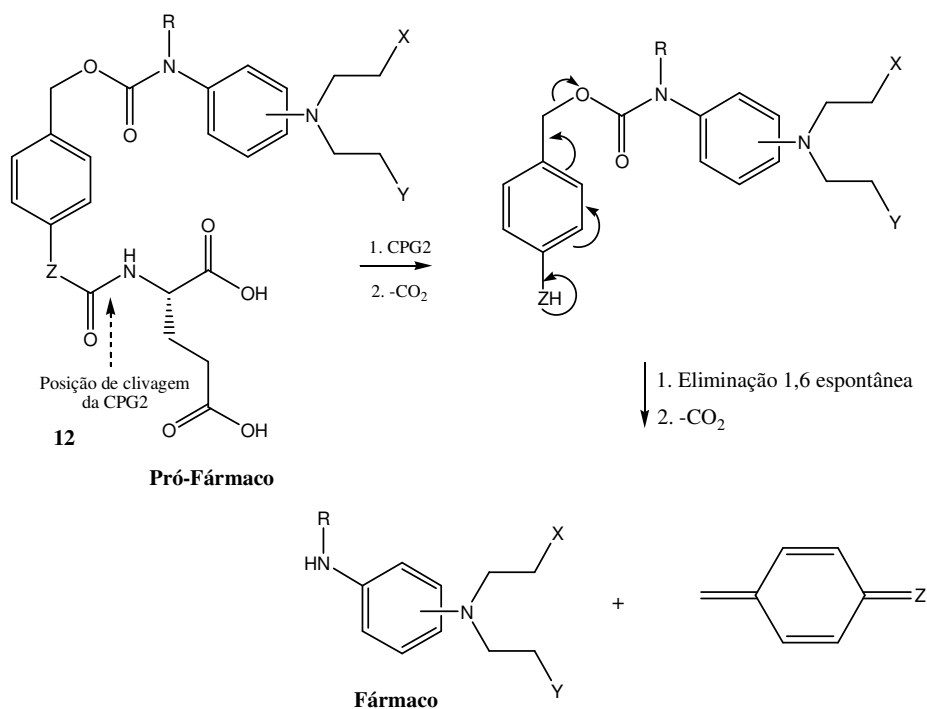
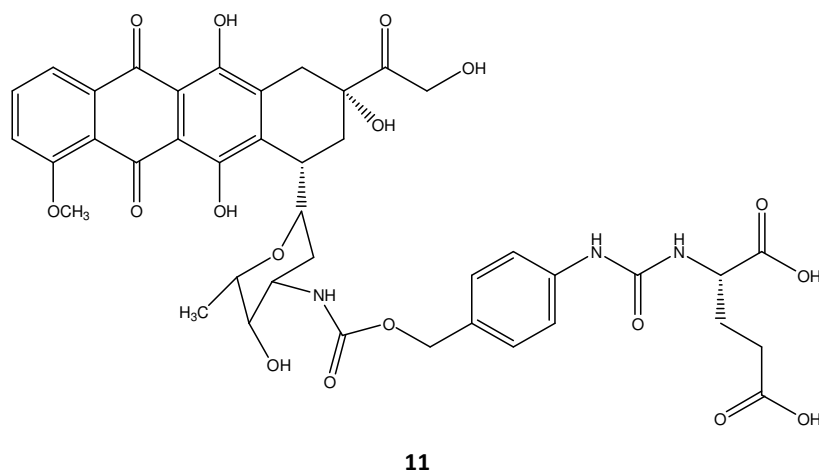
Tabela 1.1 – Estrutura, dados biológicos, cinética enzimática e reactividade química de alguns pró-fármacos.

Composto	X	Y	L	K _m (μM)	k _{cat} (s ⁻¹)	t _{1/2} (min)	k _{cat} / K _m	IC ₅₀ (μM)
7	Cl	MeSO ₃	CO	3,4	583	64	171,5	>500
8	Cl	Cl	CO	3,4	700	660	206	>500
10a	Cl	Cl	OCO	1,0	49	31	49	200
10b	Cl	Cl	NHCO	3,0	7,5	16,9	2,5	200
ZD2767	I	I	OCO	2,0	29,5	<2min	14,8	47,2

Entretanto, percebeu-se que a eficácia dos pró-fármacos em ADEPT era aumentada com a utilização de mostardas bis-iodo e desenvolveu-se o composto ácido 4[bis(2-iodoetil)amino-fenil]oxicarbonil-L-glutâmico (X = Y = I, R = H, ligação = OCO, R₁ = COOH)⁴³. Este composto, chamado ZD2767, era um bom substrato para a CPG2 (tabela 1.1). O fármaco libertado era extremamente potente contra as células tumorais e apresentava um tempo de semi-vida

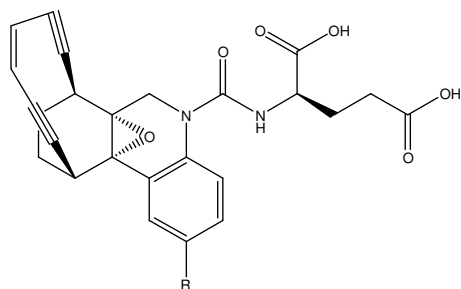
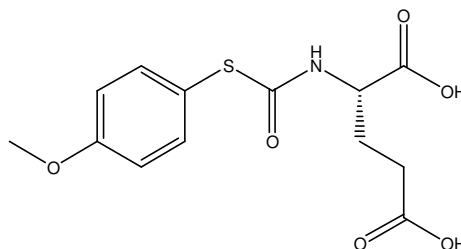
química na ordem dos segundos, prevenindo a sua libertação a partir do tumor. Em sistemas *in vivo*, este pró-fármaco era capaz de produzir regressões de longa duração do cancro e, por isso, apresentou-se como um bom candidato à avaliação clínica da estratégia ADEPT^{15,43,44,45}.

Para além das mostardas de azoto, a CPG2 tem a capacidade de activar outro tipo de pró-fármacos, como é o caso das antraciclinas *self-immolative* (**11**) e das mostardas de azoto *self-immolative* (**12**, Esquema 1.5). Neste tipo de compostos, à reacção enzimática segue-se uma segunda reacção de degradação não enzimática rápida, quantitativa e que garante uma completa irreversibilidade^{15,33,46}.



Esquema 1.5

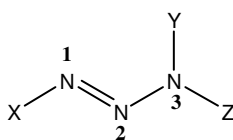
O composto **13** é outro exemplo de pró-fármaco activado pela CPG2, cuja eficácia já foi avaliada num paciente. Curiosamente, existem também descritos substratos (**14**) que são inibidores competitivos da CPG2 e que devem ser capazes de inibir a formação do fármaco em sítios remotos ao tecido tumoral^{19,33}.

**13****14**

1.4 Triazenos

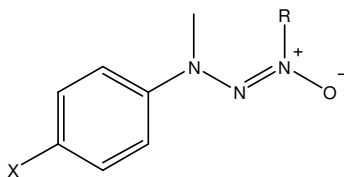
1.4.1 Os Triazenos como Agentes Anti-Tumorais

Os triazenos (**15**) são compostos químicos de cadeia aberta contendo três átomos de azoto consecutivos, que integram o grupo dos agentes alquilantes. A sua nomenclatura, de acordo com as regras IUPAC, classifica estes compostos como produto de substituição do triazeno (X, Y e Z = H), em que os hidrogénios são substituídos por outros grupos. Os triazenos podem ser 1,3-disubstituídos ou 1,3,3-trisubstituídos^{47,48,49,50}.

**15**

Os triazenos, descobertos em meados do século XIX, eram inicialmente usados como formas estabilizadoras de compostos diazo para obtenção de corantes de fibras. Posteriormente, foram utilizados para tingimento de plásticos, *nylon* e acetato de seda, como iniciadores para a polimerização de compostos insaturados e como reagentes analíticos para catiões metálicos. Foram também propostos para aplicação em preparações anti-tripanosomais, insecticidas, herbicidas, repelentes e fungicidas. Alguns N-óxidos de triazenos (**16**) revelaram possuir actividade anti-convulsivante e inibitória da mono-aminoxidase.

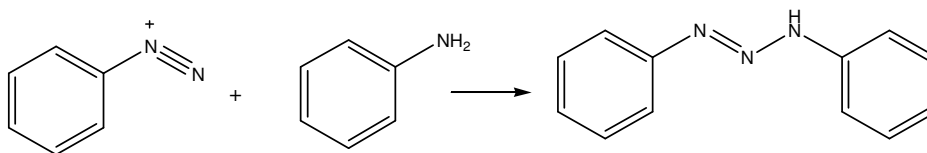
Contudo, foi na sequência da descoberta da actividade anti-tumoral e anti-metastática dos 3,3-dimetiltriazenos contra certos tumores, no início dos anos 60, que o interesse sobre os triazenos aumentou consideravelmente^{48,49}.



16

R = alquil, aril

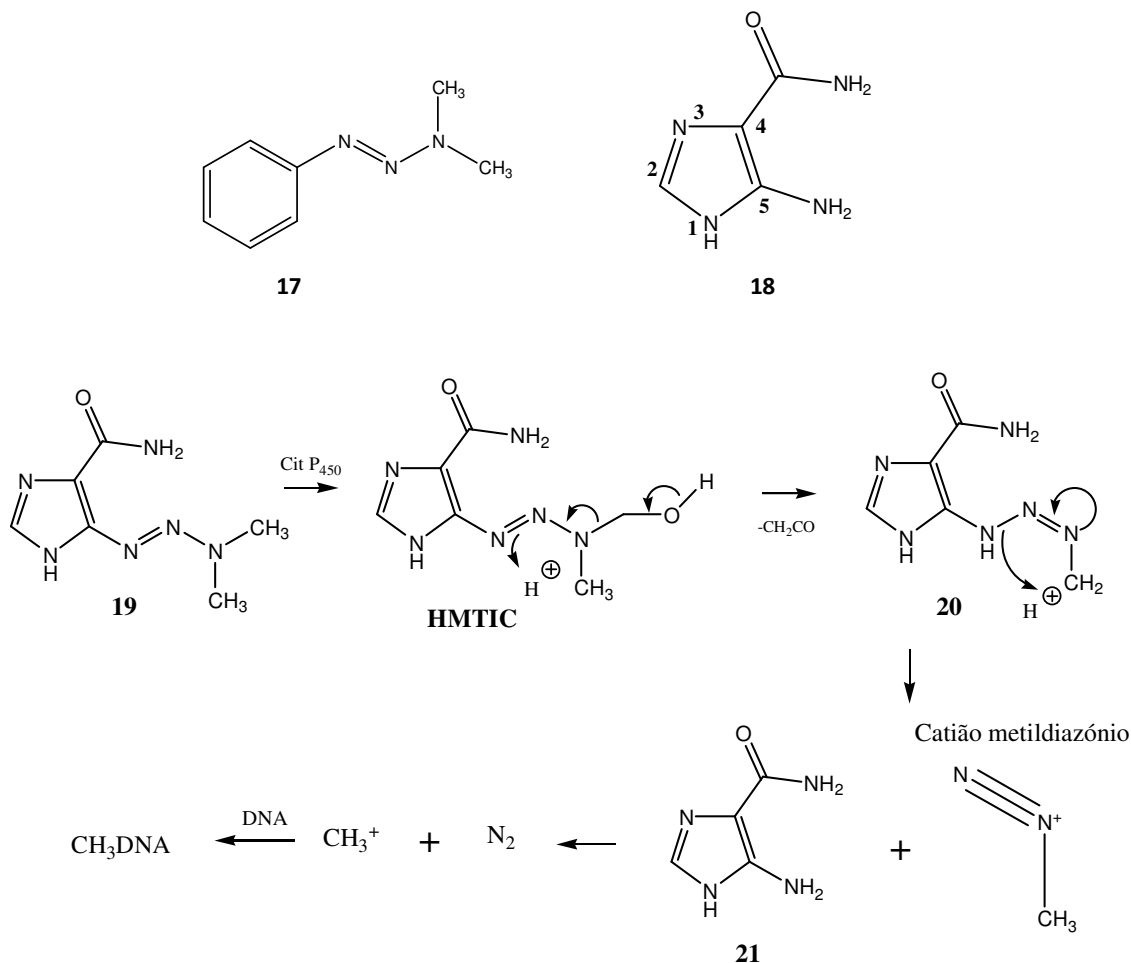
Os triazenos foram sintetizados pela primeira vez em 1862 por Griess, por acoplamento de sais de diazónio com outros compostos contendo azotos nucleofílicos (esquema 1.6)⁴⁸. Dos derivados sintetizados, os mais notáveis foram os monoalquiltriazenos e os dialquiltriazenos. Apesar das suas propriedades anti-tumorais, estes são agentes citotóxicos que possuem actividade carcinogénica, mutagénica e teratogénica. No entanto, o interesse sobre os monoalquiltriazenos baseou-se no possível papel que desempenham como metabolitos activos e agentes anti-cancerígenos relacionados com os 3,3-dialquiltriazenos⁴⁷.



Esquema 1.6

Perante a diversidade de acções biológicas, os triazenos emergiram como pontos de partida para uma investigação química e farmacológica que desse origem a novos compostos mais eficazes. Os estudos pioneiros das propriedades biológicas dos triazenos foram levados a cabo por Clarke *et al* em 1955, com os quais se demonstrou que o 1-fenil-3,3-dimetiltriazeno (**17**) inibia o crescimento do sarcoma 180 em ratos. Entretanto, durante a realização de um estudo em que o objectivo final da síntese era a obtenção de um antagonista do 5-aminoimidazol-4-carboxamida (**18**), cujo ribósido é um precursor da biossíntese de purinas, obteve-se o 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida (dacarbazina; DTIC) (**19**). A DTIC é altamente sensível à luz e sofre rapidamente fotodecomposição. É também sensível à oxidação pelo Citocromo P₄₅₀, sendo esta uma das formas de activação deste agente (esquema 1.7). Na

fase inicial do processo forma-se um composto hidroximetilado que, por perda de uma molécula de formaldeído, dá origem a um derivado monometilo (MTIC, **20**). Este, por degradação espontânea, forma o ião metildiazónio (agente alquilante) e um derivado inactivo (AIC, **21**), conhecido por ser um intermediário na síntese *de novo* da purina e o principal metabolito no plasma e na urina⁵⁰.



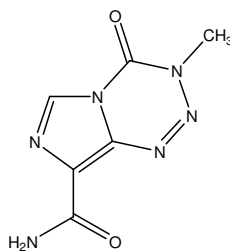
Esquema 1.7

A DTIC tem um espectro de actividade anti-tumoral relativamente variado, mas é particularmente adequada para o tratamento do melanoma maligno. Quando usado como agente único, verificou-se uma regressão dos tumores em 25% dos doentes. Pode também ser utilizada associada a outros agentes neoplásicos (adriamicina, bleomicina e vinblastina) no tratamento de linfomas malignos (doença de Hodgkin) e em sarcomas dos tecidos moles, isoladamente ou em associação^{47,50}.

A DTIC não é totalmente absorvida pelo tracto gastrointestinal e, por isso, não pode ser administrada oralmente, mas sim via endovenosa. É de referir que 40 a 50% da dose

administrada é excretada na urina sem sofrer metabolização, um pormenor importante da sua farmacocinética. Quanto ao seu modo de acção, a DTIC é um fármaco que se encontra entre os agentes alquilantes activos em todas as fases do ciclo celular e, assim, o seu mecanismo de citotoxicidade é pouco selectivo. Consequentemente, em mais de 90% dos doentes ocorrem efeitos secundários adversos, como náuseas e vómitos, e em casos muito severos isso verifica-se 3 a 4 horas depois da administração parentérica. Ocasionalmente, cerca de uma semana depois da administração, pode aparecer um síndrome tipo influenza, com febre, mialgia e mal-estar. Podem verificar-se outros efeitos como: toxicidade hepática e cardíaca, imunodepressão e toxicidade mucocutânea. Os produtos resultantes da fotodecomposição são, muito provavelmente, os responsáveis pela toxicidade cutânea da DTIC. Um efeito também muito comum e que surge como o efeito tóxico limitante da dose é a mielossupressão (neutropenia e trombocitopenia), ou seja, a depleção de elementos celulares sanguíneos da medula óssea^{47,50}.

A Temozolomida (TMZ) (**22**) é também um triazeno que faz parte dos agentes alquilantes, estrutural e funcionalmente relacionado com a DTIC e com aplicação também no tratamento do melanoma metastático. Ao contrário da DTIC, que não é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, a TMZ é utilizada no tratamento clínico de tumores cerebrais (gliomas). Este fármaco apresenta propriedades de biodisponibilidade oral, absorção e distribuição muito boas. A outra grande diferença da TMZ para a DTIC é a sua activação química, que ocorre espontaneamente a pH fisiológico através de uma conversão não-enzimática. Depois da absorção intestinal, a TMZ é hidrolisada no MTIC, o metabolito activo da DTIC, e, por isso, o mecanismo de acção é idêntico. Quanto aos efeitos secundários, causa efeitos semelhantes aos da DTIC, contudo, as náuseas e os vómitos são menos severos e menos frequentes⁵⁰.

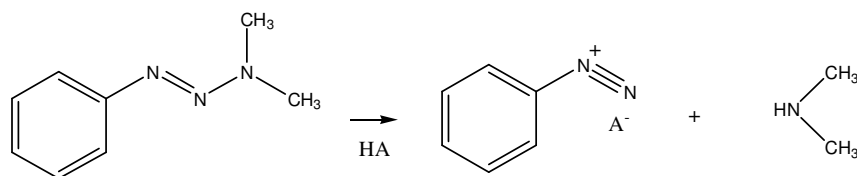


22

1.4.2 Mecanismo de Acção Anti-Tumoral dos Triazenos

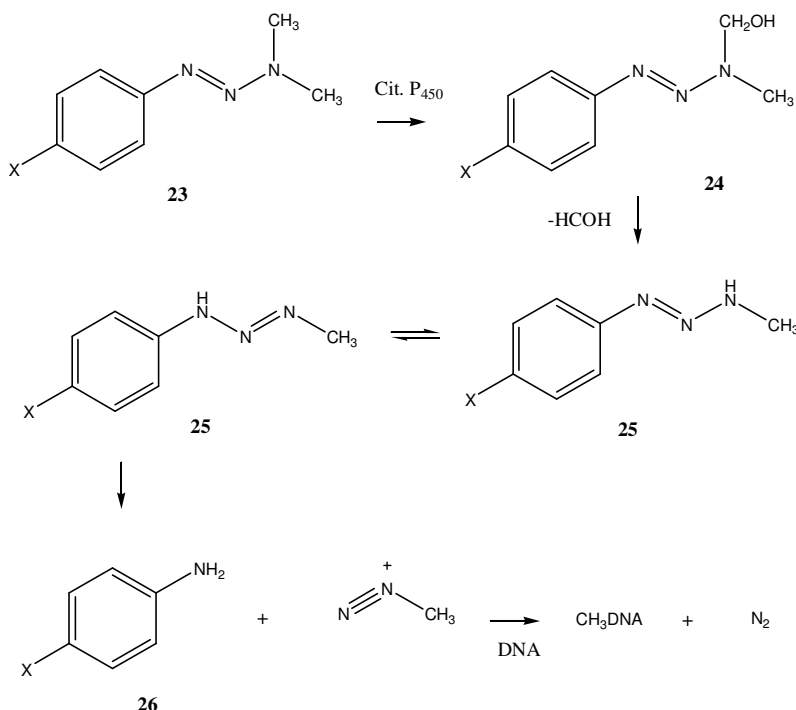
A DTIC e os seus análogos benzénicos são compostos cuja instabilidade em meio ácido dá origem a iões diazónio (esquema 1.8). Como consequência disto, considerou-se como primeira hipótese que a acção anti-tumoral destes compostos se devia à arilação ou ao acoplamento

diazónico de biopolímeros (como o DNA) pelos iões diazónio. Contudo, durante um estudo realizado por Preussmann *et al*, verificou-se que a administração oral dos dialquiltriazenos a ratos não levava à formação de tumores no estômago, o que seria de esperar que acontecesse, pois o pH do meio facilita a formação do sal de diazónio. Verificou-se também que havia a formação de tumores afastados do local de aplicação após administração sub-cutânea e, assim, a hipótese inicialmente considerada era inválida. A acção carcinogénica sistémica observada levou a que os investigadores propusessem um processo de activação metabólica enzimática⁴⁸.



Esquema 1.8

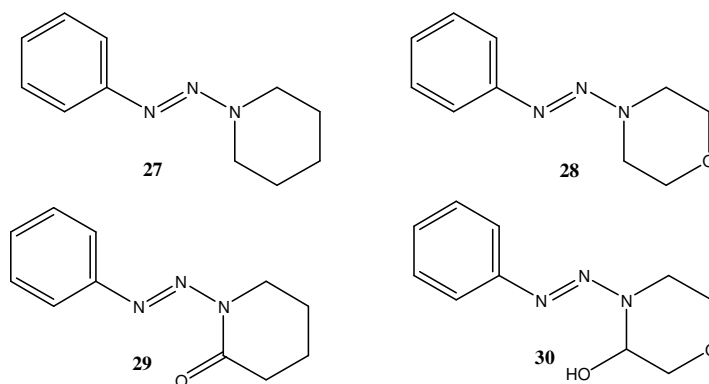
Incubaram-se vários dialquiltriazenos *in vitro* sobre culturas de células neoplásicas, na presença de um sistema gerador de NADPH e de oxigénio, com o objectivo de mimetizar o processo de activação enzimático biológico. Em relação à maior parte dos compostos verificou-se que havia libertação do correspondente aldeído, o que confirma que houve desalquilação por oxidação. Na ausência de NADPH ou de oxigénio não se verificou citotoxicidade exercida pelos dialquiltriazenos. Estes resultados levaram Preussmann a propor o processo descrito no esquema 1.9 como mecanismo anti-tumoral. Este mecanismo assume que os 1-aryl-3,3-dimetiltriazenos (DMT, **23**) sofrem N-desmetilação oxidativa. Numa fase inicial ocorre um processo de biotransformação, efectuada a nível hepático pelo Citocromo P₄₅₀, que envolve a oxidação do grupo N-CH₃, formando-se o 1-aryl-3-hidroximetil-3-metiltriazeno (HMT, **24**). Em meio aquoso ou ligeiramente ácido, o HMT seria quimicamente hidrolisado no correspondente 1-aryl-3-metiltriazeno (MMT, **25**) com perda de formaldeído. Da decomposição espontânea do MMT em meio aquoso resulta a formação da amina aromática e, muito provavelmente, do ião metildiazónio (MeN₂⁺), sendo este o agente alquilante intermediário responsável por metilar os constituintes celulares, como o DNA e o RNA. Então, ao contrário dos DMT, os MMT não necessitam de sofrer activação metabólica para exercerem a sua citotoxicidade *in vitro*⁴⁸.



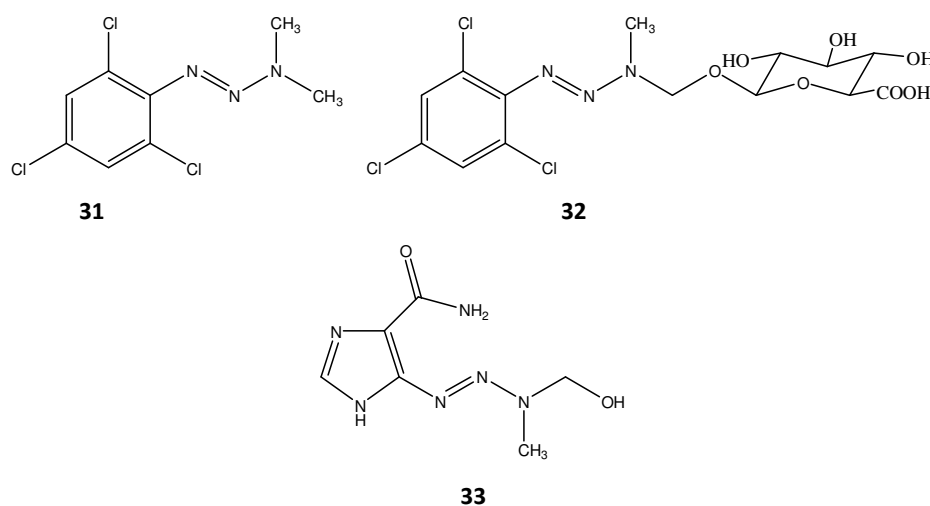
Esquema 1.9

Outras evidências que vieram confirmar o esquema proposto estão relacionadas com o isolamento de metabolitos. Da metabolização dos dialquiltriazenos por incubação com microsomas hepáticos, em que a quantidade de formaldeído libertado é proporcional à metabolização do substrato, foi possível isolar as correspondentes anilinas (**26**) como produtos de biotransformação, quer *in vitro*, quer *in vivo*^{48,51}. No caso da DTIC, por exemplo, observou-se a formação do metabolito AIC nos microsomas hepáticos de rato, em tecidos tumorais humanos e de animais⁵². Foi durante um estudo de biotransformação *in vitro* do 1-fenil-3,3-dimetiltriazeno (**17**) que se obteve uma evidência experimental directa da via de desmetilação enzimática, uma vez que Pool identificou pela primeira vez o MMT⁵³. Mais tarde, Hickman *et al*, identificaram também um MMT como produto do metabolismo do 1-(4-acetilfenil)-3,3-dimetiltriazeno⁴⁸. Nos estudos farmacocinéticos e de fase I levados a cabo por Foster *et al* identificaram e quantificaram *in vivo* os níveis plasmáticos do MMT⁵⁴.

A primeira prova directa de que a formação de intermédios α-hidroxilados corresponde à biotransformação dos dialquiltriazenos foi fornecida por Stevens *et al*, que estudaram a oxidação biomimética e o metabolismo dos triazenos heteroacíclicos (**27** e **28**) com microsomas hepáticos de murganinhos. Daqui isolaram os respectivos metabolitos α-oxidados (**29** e **30**)⁴⁸.



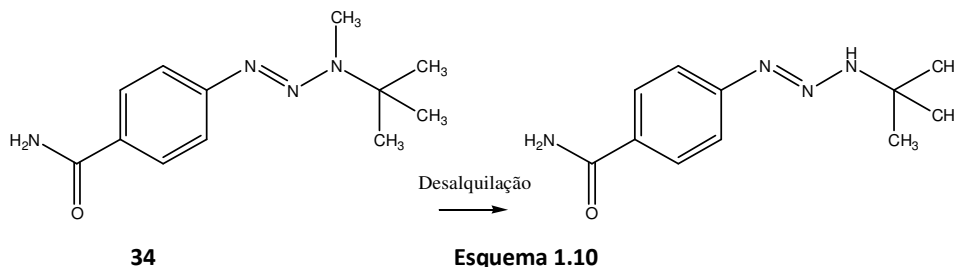
Kolar e Carubelli, durante o estudo do metabolismo do 1-(2,4,6-triclorofenil)-3,3-dimetiltiazeno (**31**) em ratos, conseguiram isolar o O-glucoronido da urina (**32**), cuja estrutura foi confirmada por RMN e espectroscopia de massa. Assim, pressupõe-se que um dos grupos N³-Me tenha sido metabolicamente oxidado e, conseqüentemente, o oxigênio envolveu-se numa ligação O-glicosídica. Mais tarde, Kolar *et al* acabaram por isolar e identificar em ratos o 5-(3-hidroximetil-3-metiltiazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida (**33**), um metabolito urinário α -hidroxilado da DTIC⁴⁸.



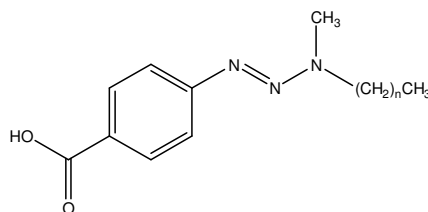
Relativamente à alquilação de biopolímeros, após administração em ratos de 1-fenil-3,3-dimetiltiazeno (**17**) com os grupos metilo marcados (¹⁴C), Krüger *et al* isolaram do DNA e RNA de fígado, rins e cérebro as bases dos ácidos nucleicos e verificaram que estavam marcadas com ¹⁴C⁴⁸.

Rondestedt, ao realizar os primeiros estudos de relação estrutura-atividade dos 1-aryl-3,3-dialquiltiazenos contra o sarcoma 180 de ratos, verificou a necessidade da presença de pelo menos um grupo metilo em N-3 para que haja inibição do tumor. Para além disso,

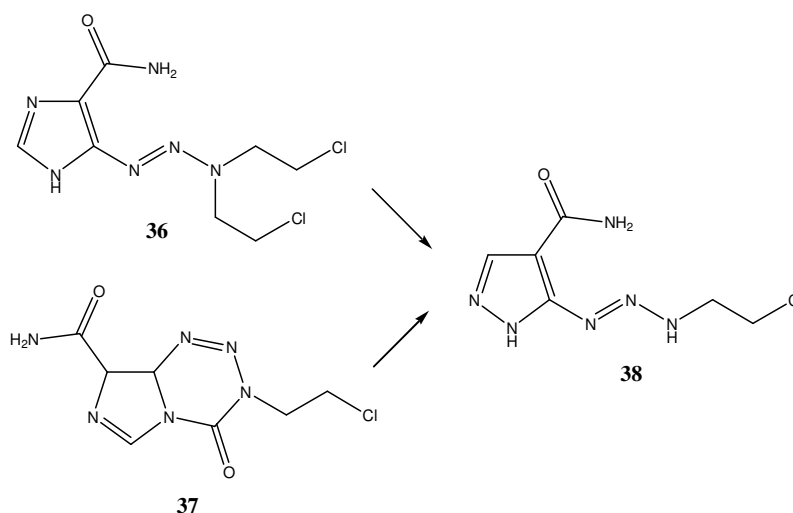
concluiu que os 1-aryl-3,3-dialquiltriazenos em que ambos os grupos alquil eram maiores que o metilo, bem como os que possuíam um anel heterocíclico incorporando o N-3, eram inactivos. Estes últimos, apesar da ausência de actividade anti-tumoral, são cancerígenos. Verificou ainda que a presença de um ou mais substituintes no anel benzénico não era relevante, sendo até viável a sua substituição por um anel hetero-aromático^{55,56}. Connors *et al* alargaram este estudo a uma série de outros compostos chegando às mesmas conclusões. Por outro lado, verificaram que compostos como o 1-(4-carbamoilfenil)3-metil-3-*terc*-butiltriazeno (**34**) não apresentam efeito quimioterápico. O que acontece é que, para além da obrigatoriedade da existência do grupo metilo em N-3, o outro substituinte tem de ser um grupo metabolizável, ou seja, é imprescindível que no carbono do N-3 exista um hidrogénio. Tal não se verifica neste composto, pois o metabolito mono-*terc*-butiltriazeno que se forma não tem nenhum grupo metilo, logo não é um inibidor tumoral (esquema 1.10)⁴⁸.



Outro dos factores que também afecta a actividade anti-tumoral dos dialquiltriazenos é a dimensão do grupo alquilo substituinte em N-3. Na investigação da acção de uma série homóloga (**35**) contra o linfoma TLX5, Wilman e Goddard constataram que, aumentando o número de átomos de carbono do substituinte alquílico, aumentava também a actividade quimioterápica, atingindo um máximo com o derivado pentilo ($n = 5$). Com cadeias maiores, a actividade diminui drasticamente, sendo os compostos inactivos quando $n = 8$ ou 9. Os autores ainda tentaram estabelecer uma correlação entre esta acção, a solubilidade e os coeficientes de partilha octanol-água, mas não foi possível. O que sugeriram foi que o aumento de n poderá levar a uma alteração na extensão ou no tipo de metabolismo ou alterar a estabilidade dos intermediários metabólicos^{55,57}.



Curiosamente, é de referir que estão descritos triazenos com actividade anti-leucémica, mas que não contêm grupos metilo. Entre esses podemos encontrar os 3,3-bis-cloroetil-triazenos (**36**) e a mitozolamida (**37**). Ambos têm a capacidade de formar o monocloro-etil-triazeno (**38**), este sim um potente agente alquilante do DNA (esquema 1.11)⁴⁸.



Esquema 1.11

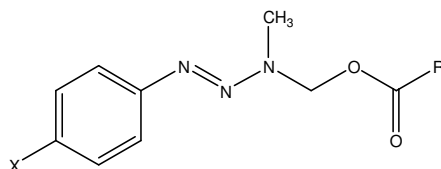
1.4.3 Estabilidade Química e Actividade Biológica de Derivados Triazénicos

Os estudos de actividade anti-tumoral dos DMT atrás mencionados provam que estes compostos são pró-fármacos, uma vez que só são activos após N-desmetilação metabólica. A DTIC, por exemplo, só exerce a sua citotoxicidade como resultado da sua conversão num agente alquilante. Contudo, realizaram-se estudos comparativos da quantidade de N-desmetilação entre diferentes espécies animais (homem, rato e ratinho) que mostraram que o homem é um mau metabolizador da DTIC, sendo daí que resulta, muito provavelmente, a sua fraca eficácia clínica. Por outro lado, através da administração directa dos metabolitos activos comprovou-se que, tanto os HMT como os MMT são compostos sem interesse para aplicação em quimioterapia. São agentes citotóxicos não selectivos que não possuem a estabilidade necessária para tal. Deste modo, sintetizaram-se vários tipos de derivados triazénicos dos HMT e dos MMT, tendo como objectivo a obtenção de compostos que, por um lado, não necessitassem de sofrer oxidação metabólica e que, por outro lado, tivessem a estabilidade necessária para serem substitutos dos DMT.

1.4.3.1 Derivados dos HMT

Ésteres

Os primeiros candidatos propostos. Sintetizou-se uma série de ésteres acetoxi e benzoiloximetilo (**39**). No entanto, em meio aquoso, estes compostos decompõem-se instantaneamente nos correspondentes MMT, não podendo, por isso, ser considerados como alternativa aos DMT^{48,58,59}.

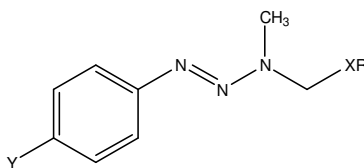


39

R = CH₃, Ph

Éteres e Tioéteres

Obteve-se uma série de dialquiltriazenos com ligação éter na posição α (**40**)⁵⁸. Os estudos de estabilidade química indicam que, em tampão fosfato a pH 7.5, os alcoximetiltriazenos (R = CH₃, X = O) são bastante estáveis, o que não acontece com os ariltiometiltriazenos (R = aril, X = S) que se decompõem rapidamente. Isto indica que a facilidade de hidrólise parece depender muito da estrutura do composto^{48,60,61}. A actividade anti-tumoral de alguns derivados (R = CH₃, X = O) foi testada e verificou-se que, contra alguns tumores TLX5 *in vivo* existe actividade, mas *in vitro* estes compostos não são activos. Uma observação consistente com a sua estabilidade química e que leva a crer que é necessária activação metabólica, provavelmente O-desmetilação enzimática, para formação da espécie activa.



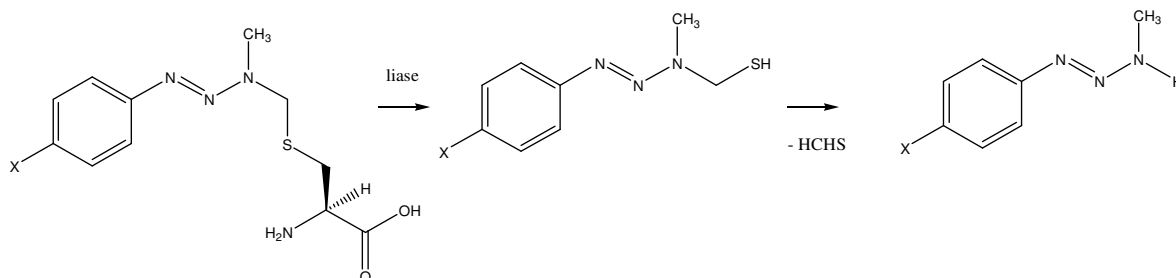
40

R = CH₃, aril, alquil
X = O, S

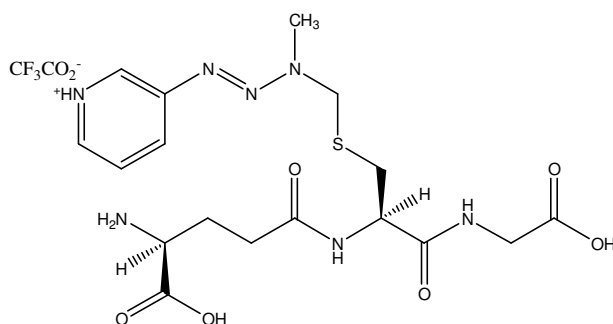
Derivados de Conjugação com a Glutathione e Compostos Relacionados

Sintetizaram-se compostos com base nos derivados que se formam no processo metabólico do ácido mercaptúrico, para que esta fosse uma forma de transporte do pró-

fármaco do MMT, libertado depois *in vivo* por intermédio da β -liase (esquema 1.12). Tioéteres derivados do 3-HMT e da glutatona (**41**), cisteína e N-acetilcisteína foram sintetizados. No entanto, os estudos da sua actividade biológica em homogeneizados hepáticos (onde a β -liase apresenta elevada actividade enzimática) mostraram que estes compostos não são bons substratos e que não exercem citotoxicidade frente a várias linhas de células tumorais^{48,62}.



Esquema 1.12



41

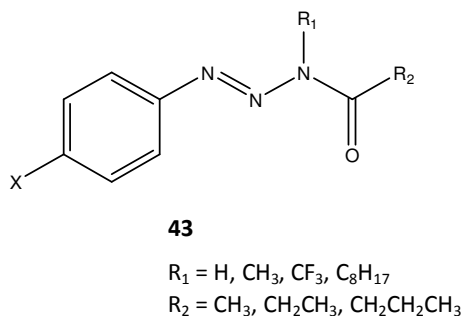
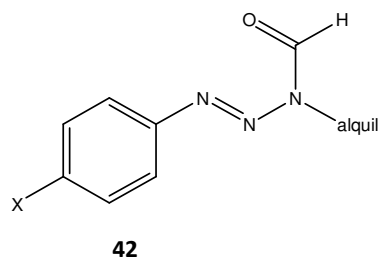
1.4.3.2 Derivados dos MMT

Aciltriazenos

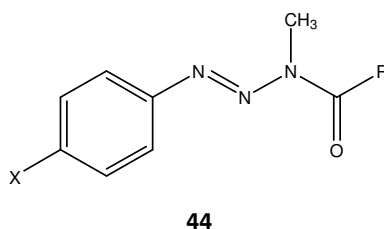
Pool, ao isolar e identificar o 3-acetil-3-metil-1-feniltriazeno como resultado da oxidação microsomal do 3,3-dimetil-1-feniltriazeno (**17**), propôs os acetiltriazenos como forma de transporte dos MMT *in vivo*, capazes de libertar o agente biologicamente activo por clivagem do grupo acetilo em órgãos alvo contendo enzimas específicas. Perante a estabilidade que possuíam, estes compostos foram considerados potenciais pró-fármacos, funcionando como alternativa aos DMT⁵⁴.

A síntese dos 3-alkuil-3-formil-1-ariltriazenos (**42**) foi feita por oxidação biomimética dos correspondentes 3-alkuil-3-metilo, 3-alkuil-3-hidroximetilo e 3-alkuil-3-metoximetiltriazenos. Relativamente à formação dos formiltriazenos *in vivo* não há evidências de que aconteça.

Contudo, estes e os aciltriazenos em geral (**43**) sofrem decomposição por catálise básica, dando origem ao MMT, pelo que se apresentam como potenciais pró-fármacos⁴⁸.



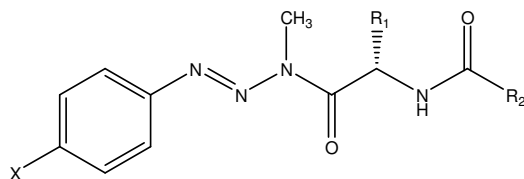
Mais tarde, estudou-se a decomposição dos 1-aryl-3-acil-3-metiltriazenos (**44a-d**) em ácido sulfúrico aquoso e, à excepção do **44d**, os derivados revelaram-se extraordinariamente estáveis a pH 7.4 e pouco solúveis em água⁶³. Posto isto, a estratégia seguinte passou por sintetizar e estudar a hidrólise em plasma de uma nova série de pró-fármacos de triazenos derivados de α -aminoácidos (**44e-i**). Estes aminoaciltriazenos revelaram-se mais reactivos, como consequência do forte efeito electroatractor do grupo amina livre quando protonado, o que poderá comprometer, muito provavelmente, a sua utilidade como pro-fármacos. Contudo, os autores verificaram que a acilação do grupo amina (**44i**) era um método simples e eficaz de reduzir a reactividade química dos derivados α -aminoácidos, mantendo contudo uma rápida velocidade de hidrólise enzimática^{64,65}.



$R = \text{H}$ (**44a**), alquil (**44b**), aril (**44c**), CF_3 (**44d**)
 $R = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{NH}_2$ (**44e**), $\text{CH}(\text{CH}_2\text{Ph})\text{NH}_2$ (**44f**), CH_2NH_2 (**44g**), $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ (**44h**), $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{NHAc}$ (**44i**)
 $X = \text{CN}, \text{COCH}_3, \text{COOCH}_2\text{CH}_3, \text{CONH}_2, \text{Br}, \text{CH}_3$

Mais recentemente, sintetizou-se uma nova série de triazenos derivados de *N*-acil aminoácidos ligados via N-3 ao triazeno, os 3-[α -(acilamino)acil]-1-aryl-3-metiltriazenos (**45**). Estes compostos apresentam dois grupos funcionais amida susceptíveis a hidrólise, o grupo *N*-acilo e o grupo amida do triazeno. Contudo, os resultados obtidos apontam para que a hidrólise ocorra via amida do triazeno. A acilação do grupo α -amino mostrou ser um meio

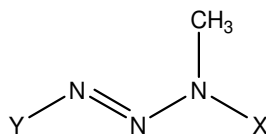
eficaz de redução da reactividade química dos derivados α -aminoacilo e, para além disso, a velocidade de hidrólise enzimática mantém-se rápida. Assim, estes compostos revelaram-se um promissor sistema de pró-fármacos dos MMT anti-cancerígenos⁶⁶.



45

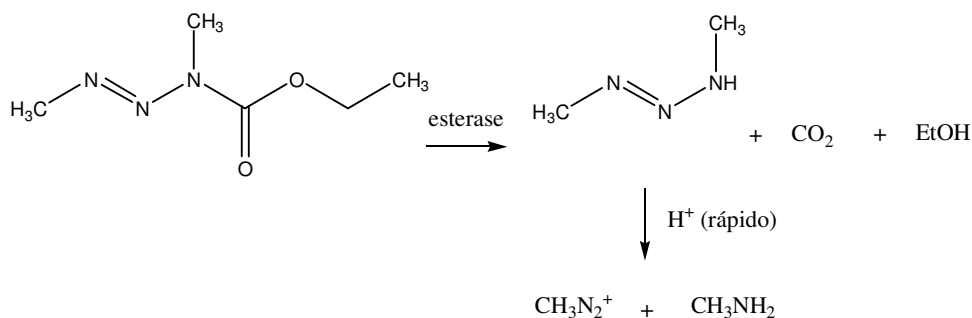
$R_1 = \text{H, CH}_3, \text{CH}_2\text{Ph, CH}(\text{CH}_3)_2$
 $R_2 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3, \text{Ph}$
 $X = \text{CN, COCH}_3, \text{COOCH}_2\text{CH}_3, \text{CONH}_2, \text{Br}$

Existe um outro grupo de triazenos que também tem sido alvo de estudos de estabilidade química e actividade biológica que são os trialquiltriazenos e seus derivados (**46**). Apesar das suas propriedades mutagénicas, cancerígenas e anti-tumorais, semelhantes às dos seus análogos arildialquiltriazenos, os trialquiltriazenos não se mostraram bons candidatos a medicamentos, devido à instabilidade química que apresentam em soluções aquosas a pH próximo da neutralidade. Os 3-acil-1,3-dimetiltriazenos em que $Y = \text{CH}_3$ apresentam-se como compostos muito mais estáveis em condições fisiológicas e as suas velocidades de decomposição variam bastante com a estrutura da função acil. No estudo realizado sobre estes compostos verificou-se que a mutagenicidade de um deles aumentava na presença de esterases (fígado de porco), indicando que a enzima tem a capacidade de hidrolisar o grupo carbetoxi libertando, desta forma, o 1,3-dimetiltriazeno altamente reactivo (esquema 1.13)^{67,68}.



46

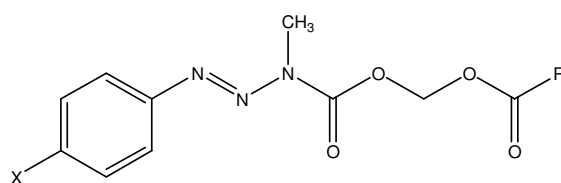
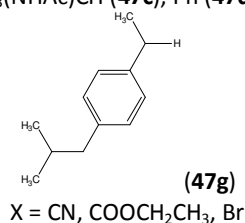
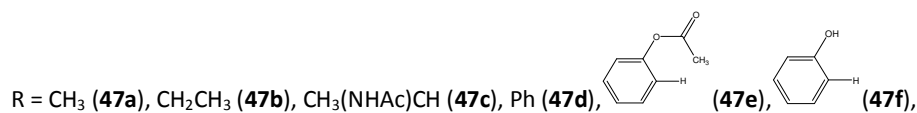
$X = \text{CH}_3, \text{COCH}_3, \text{COOCH}_2\text{CH}_3, \text{CONHCH}_3, \text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_2$
 $Y = \text{CH}_3, \text{Cl}(\text{CH}_2)_2, \text{EtOH}$



Esquema 1.13

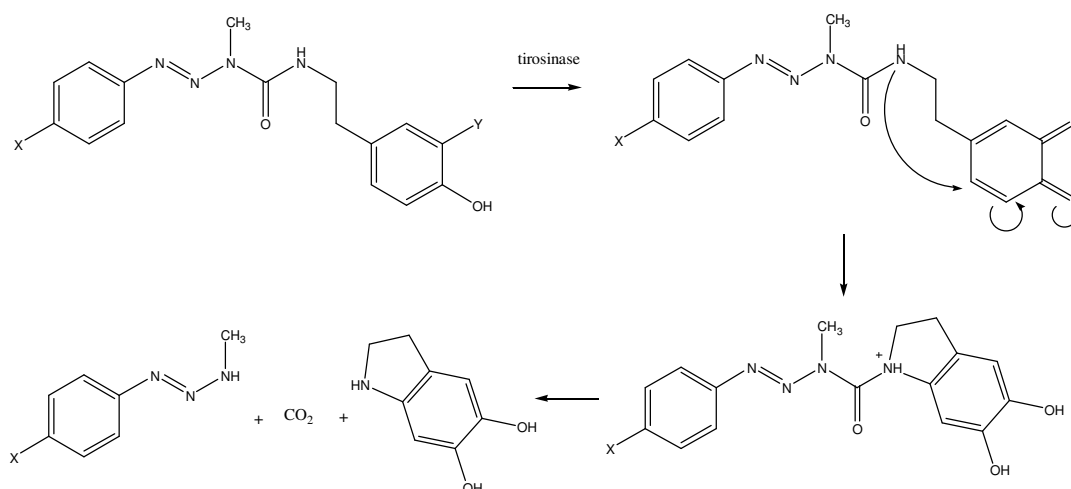
Aciloxicarbamatos

Um estudo realizado sobre os aciloximetilcarbamatos (**47**) demonstrou que estes derivados representam uma boa alternativa como pró-fármacos de triazenos anti-tumorais, uma vez que dispensam a N-desmetilação oxidativa e que a sua hidrólise sofre catálise ácida e básica bem como catálise pelos tampões. A hidrólise ocorre preferencialmente na função éster. Os estudos de estabilidade em plasma humano mostraram que os compostos são substratos para as enzimas plasmáticas, libertando-se o MMT. Estes derivados, ao apresentarem elevada estabilidade química associada a uma rápida activação enzimática, apresentam melhores características como pró-fármacos em comparação com outros sistemas previamente estudados. Uma outra vantagem destes agentes é funcionarem como pró-fármacos mútuos, ou seja, possuem dois fármacos, normalmente sinérgicos, ligados um ao outro. Os compostos **47e-g** conjugam o agente anti-tumoral com o agente anti-inflamatório e o composto **47b** que liberta ácido butírico, um produto natural não tóxico com actividade anti-tumoral⁶⁹.

**47**

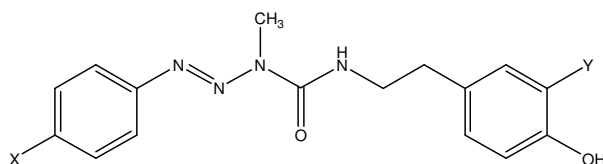
Derivados Contendo um Domínio Substrato de uma Enzima

Perante a necessidade de encontrar um tratamento para o melanoma maligno, tentou desenvolver-se uma estratégia que faz uso de pró-fármacos de triazenos capaz de libertar o agente metilante nas células tumorais por acção enzimática, ou seja, uma estratégia MDEPT. Uma vez que os MMT funcionam como bons grupos abandonantes, considerou-se que, acoplando estes agentes a substratos da tirosinase seria uma boa forma de obter pró-fármacos capazes de originar o metabolito alquilante (esquema 1.14) por acção oxidativa da tirosinase. O acoplamento entre o MMT e a tiramina ou a dopamina fez-se via ligação ureia.



Esquema 1.14

Sintetizaram-se vários pró-fármacos (**48**) que, posteriormente foram avaliados como substrato da tirosinase. A sua estabilidade em tampão fosfato pH 7.4 e em plasma humano foi também avaliada. Estes compostos revelaram-se altamente estáveis, quer em tampão quer em plasma, e simultaneamente bons substratos da tirosinase. Embora tenham mostrado ser bons substratos da enzima, verificou-se que a libertação do fármaco activo não ocorreu como se esperava, ou seja, o processo de ciclicação (esquema 1.14) não é eficiente na libertação do agente anti-tumoral²⁶.



X = CH₃CO, COOCH₂CH₃, CN, CH₃
Y = H, OH

1.5 Âmbito da Tese

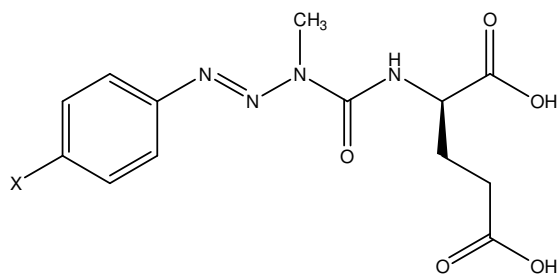
A taxa de aprovação de novos agentes para o tratamento do cancro tem vindo a diminuir ao longo da última década e, até à data, apenas um composto novo foi aprovado (em 2008)⁷⁰. A quimioterapia tradicional é ainda o tratamento mais utilizado. Contudo, os agentes citotóxicos dos quais faz uso não são específicos para o local do tumor. A sua selectividade assenta no pressuposto de que as células tumorais em rápida proliferação são mais susceptíveis ao efeito citotóxico do fármaco. Porém, as células normais que são também de rápida proliferação não escapam à acção do fármaco. Consequentemente, a toxicidade contra os tecidos normais constitui a grande desvantagem desta abordagem do tratamento do cancro. Tornar selectiva a libertação do agente citotóxico por acção de um agente transportador com especificidade para o local do tumor é uma das soluções promissoras.

A DTIC é até hoje o único agente quimioterapêutico aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento do melanoma maligno. Entre muitos outros compostos testados contra este tipo de cancro, a DTIC é o mais activo e, por isso, é considerado um pró-fármaco referência. Existem outros fármacos anti-cancerígenos relacionados com a DTIC, mas com reduzida selectividade para as células tumorais: os 1-aryl-3,3-dimetiltriazenos. A acção biológica da DTIC e dos DMT deve-se à sua capacidade em alquilar o DNA via correspondente MMT. Posto isto, desenvolver uma estratégia que utilize pró-fármacos de triazenos capazes de libertar o agente alquilante no local do tumor pode levar a progressos no tratamento do cancro²⁶.

Sabendo que a enzima bacteriana CPG2 conjugada a um anticorpo monoclonal específico para as células tumorais tem a capacidade de activar pró-fármacos, conjugar o MMT a substratos desta enzima pode ser uma boa forma de identificar pró-fármacos anti-tumorais eficazes. Com o objectivo de obter pró-fármacos para aplicação numa estratégia ADEPT, considerou-se no seu planeamento:

- ✓ A estrutura dos MMT, como agentes alquilantes capazes de metilar o DNA;
- ✓ A estrutura do substrato para a enzima activadora CPG2, adequada para conferir selectividade para o local de acção do pró-fármaco;
- ✓ E a ligação do tipo ureia entre o MMT e o substrato da CPG2, onde se espera que a enzima actue.

Para isso, neste trabalho sintetizaram-se novos pró-fármacos de ariltriazenos contendo ácido glutâmico que, sendo substrato da CPG2, funciona como transportador do MMT (49) (Capítulo 2).

**49**

X = CN, Br, CH₃, COCH₃, COOCH₂CH₃, CONH₂

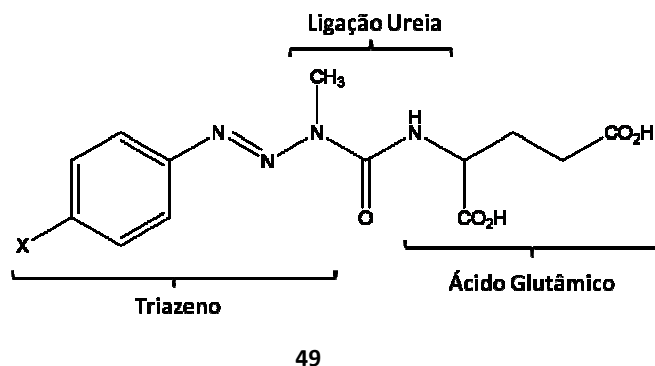
Tendo em vista a avaliação destes derivados como pró-fármacos, avaliou-se a sua estabilidade química em condições fisiológicas de pH e temperatura (tampão fosfato pH 7.4, 37°C), em plasma humano e em albumina humana. Realizaram-se também estudos cinéticos da estabilidade em presença da CPG2 a fim de avaliar os pró-fármacos como substratos da enzima (afinidade) e a eficácia de libertação do fármaco (validação da estratégia ADEPT) (Capítulo 3).

Capítulo 2

Síntese dos Triazenos Derivados de Ácido Glutâmico

2.1 Introdução

A síntese dos compostos **49** (tabela 2.1), pró-fármacos de triazenos anti-tumorais, envolve a formação de uma ligação ureia, resultante da junção entre a função amina do ácido glutâmico e o azoto 3 do triazeno.



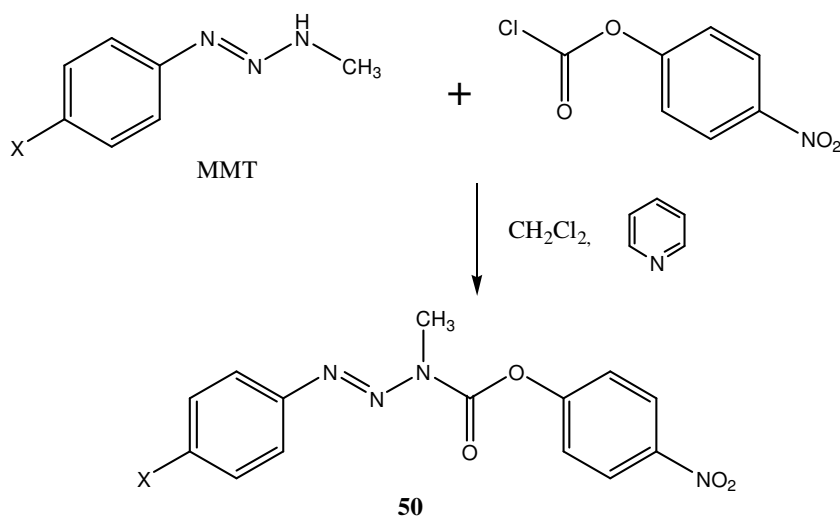
Para obter este tipo de ligação recorreu-se ao acoplamento do triazeno activado com o aminoácido protegido nas funções ácido carboxílico e, por último, removeram-se os grupos protectores.

Tabela 2.1 – Triazenos derivados do ácido glutâmico (**49**).

Composto	Substituinte em X
49a	CN
49b	Br
49c	CH ₃
49d	COCH ₃
49e	COOCH ₂ CH ₃
49f	CONH ₂

2.1.1 Activação do Triazeno

A metodologia adoptada para activação do triazeno consistiu na formação de derivados 4-nitrofenilo (**50**), por reacção do MMT com o cloroformato de 4-nitrofenilo (esquema 2.1). Estes carbamatos intermédios, por terem um bom grupo abandonante (4-nitrofenol), vão sofrer depois um ataque nucleofílico pelo grupo amina livre do ácido glutâmico, ocorrendo a cisão da ligação oxigénio-acilo e formando-se como produto final os pró-fármacos derivados de triazenos contendo ácido glutâmico como transportador (**49**).

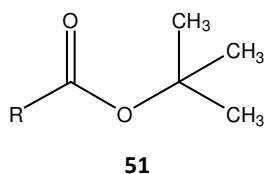


Esquema 2.1

2.1.2 Protecção dos Grupos Ácido Carboxílico

Os grupos protectores são grupos normalmente introduzidos numa molécula por modificação química com o objectivo de conferir selectividade em sínteses que envolvem moléculas multifuncionais ou que envolvem múltiplos passos. Deste modo, apenas uma das funções da molécula vai reagir e evita-se a reacção antecipada ou indesejada de determinada função. Os grupos protectores servem, então, para proteger partes ou grupos das moléculas do ambiente químico a que são sujeitas durante um processo de síntese.

Na escolha do grupo protector importa que este seja de fácil remoção no final da síntese e que o processo não afecte a estabilidade da molécula. Na síntese dos pró-fármacos **49** utilizou-se o ácido glutâmico protegido nas duas funções ácido carboxílico com o grupo Boc (éster *tert*-butílico, **51**), para que a função a reagir com o MMT fosse o grupo amina terminal e não uma das funções ácido carboxílico.



O grupo Boc pertence ao conjunto de grupos protectores da função ácida que sofrem clivagem em meio ácido moderado, geralmente ácido trifluoroacético ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$) ou ácido clorídrico (HCl). Para além disso, é estável na presença da maioria das bases e nucleófilos que possam estar presentes no meio⁵⁵.

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Síntese dos Derivados 4-nitrofenilo

A síntese dos compostos **50** (tabela 2.2) consistiu na reacção do MMT com o cloroformato de 4-nitrofenilo na presença de piridina, à temperatura ambiente, como já se mostrou no esquema 2.1. Os produtos obtidos (carbamatos), que têm a vantagem de serem sólidos cristalinos e estáveis, foram isolados por cromatografia em coluna e purificados por recristalização. Este método de síntese provou ser eficaz, com rendimentos de 8 a 55 %, correspondendo o menor ao derivado **50f**.

Tabela 2.2 – Derivados 4-nitrofenilo (**50**).

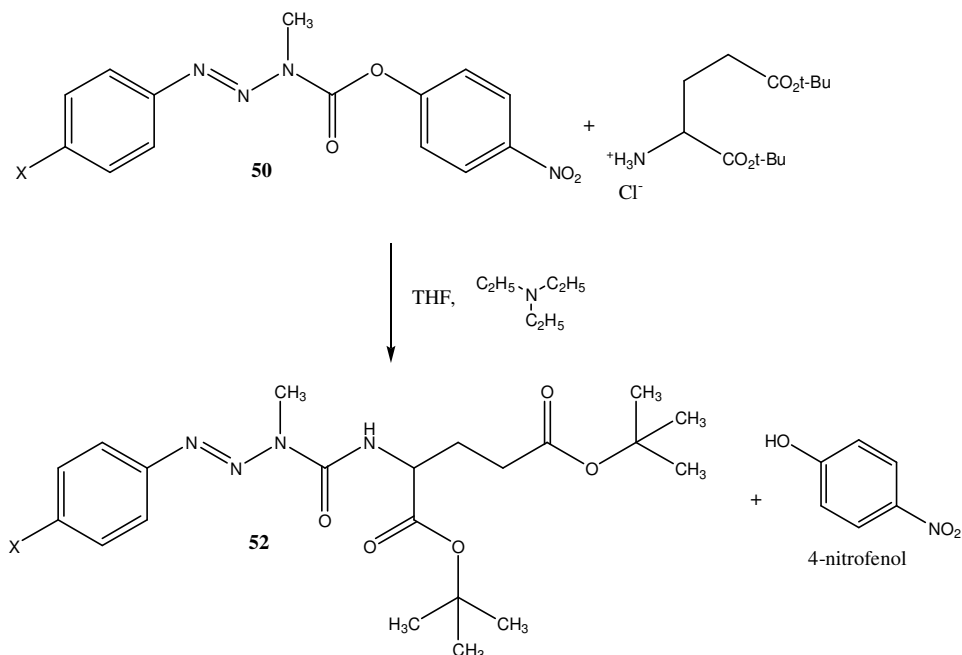
Composto	Substituinte em X	Rendimento (%)
50a	CN	45
50b	Br	55
50c	CH ₃	46
50d	COCH ₃	21
50e	COOCH ₂ CH ₃	42
50f	CONH ₂	8

2.2.2 Síntese dos Derivados do Ácido Glutâmico Protegido

A síntese dos vários derivados protegidos de triazenos **52** (tabela 2.3) consistiu na reacção do aminoácido (ácido glutâmico) protegido com o grupo Boc nas funções ácido carboxílico com os derivados activados do MMT na presença de trietilamina (esquema 2.2), sempre à temperatura ambiente. A maioria das reacções não foi completa, pelo que, por cromatografia em coluna, se separaram não só os produtos pretendidos, mas também o derivado 4-nitrofenilo que não reagiu, o 4-nitrofenol e a amina aromática resultante da decomposição parcial do MMT. Contudo, é de referir que os rendimentos obtidos variam entre os 77 e os 100%, o que nos indica que este é um bom método de síntese.

Tabela 2.3 – Derivados com o grupo Boc (**52**).

Composto	Substituinte em X	Rendimento (%)
52a	CN	77
52b	Br	97
52c	CH ₃	88
52d	COCH ₃	92
52e	COOCH ₂ CH ₃	80
52f	CONH ₂	100



Esquema 2.2

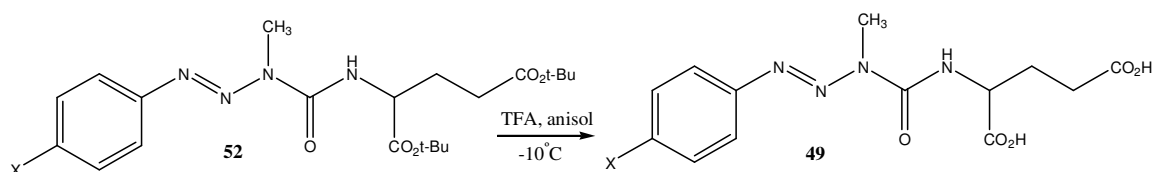
Todos os compostos obtidos após separação por coluna de cromatografia se apresentaram inicialmente sob a forma de óleo e, à exceção dos compostos **52a** e **52b**, não foi encontrada a mistura de solventes ótima de recristalização dos produtos. Mais tarde, conseguiu-se induzir a recristalização (sem solventes) para os derivados **52c** e **52f**, isto é, o óleo evoluiu para uma estrutura cristalina com o passar do tempo.

2.2.3 Desbloqueamento dos Grupos Ácido Carboxílico

Para obter os pró-fármacos com as funções ácido livres, procedeu-se à remoção do grupo protector Boc. Esta reacção revelou-se bastante complicada, tendo sido feitas várias tentativas para que ocorresse desprotecção sem que se verificasse a degradação do composto.

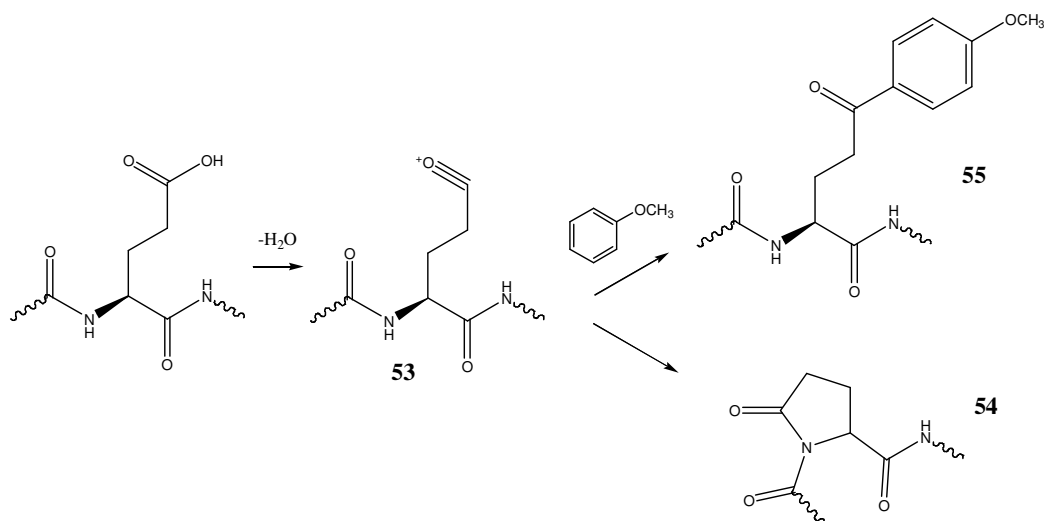
Inicialmente, em mistura TFA-diclorometano e à temperatura ambiente, durante 3 horas, verificou-se que o processo de desbloqueamento não era completo.

Os melhores resultados de desbloqueamento foram conseguidos com a utilização de uma mistura de TFA e anisol ($\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_5$), em diclorometano, mantendo a solução em gelo durante 4 a 5 horas (esquema 2.3). Contudo, por vezes, ocorreu degradação dos produtos de desbloqueamento e verificou-se a presença de quantidades razoáveis de amina aromática. Os produtos obtidos apresentavam-se sob a forma de óleo e não foram purificados.



Esquema 2.3

O papel que o anisol desempenha neste tipo de reacções é como *scavenger* de catiões, favorecendo a remoção do grupo protector Boc. O anisol possui um efeito promotor na clivagem ácida dos grupos protectores, por um mecanismo de “*push-pull*”. Na realidade, o anisol capta o catião *terc*-butílico na posição *para*. Para além disso, é-lhe também atribuído o efeito de supressão de certas reacções secundárias indesejadas nos processos de remoção de grupos protectores, como a que está descrita para o caso do glutamato, em que ocorrem rearranjos que conduzem à ciclização. Neste caso, a função carboxílica γ , protonada na presença de um ácido forte, pode perder uma molécula de água e formar um ião acílio (**53**) capaz de ciclizar num anel pirrolidina (**54**) ou pode ser “capturada” por um *scavenger* (como o anisol) e formar uma cetona (**55**) (esquema 2.4)^{71,72,73}.



Esquema 2.4

Na tentativa de ultrapassar o problema da degradação dos compostos durante a reacção de desprotecção dos grupos ácido carboxílico, recorreu-se a outro sistema de desprotecção dos compostos por uso de ácido clorídrico e nitrometano. Com este processo, o desbloqueamento revelou-se muito mais rápido. No entanto, também a decomposição do pró-

fármaco ocorreu em maior escala e, por isso, abandonou-se a hipótese de desbloqueamento por esta técnica.

2.3 Caracterização Espectroscópica

2.3.1 Caracterização dos Derivados 4-nitrofenilo

Espectroscopia de ^1H -RMN

Na secção 4.6.2.1. do capítulo 4 é possível encontrar a descrição completa dos valores de desvio químico obtidos nos espectros de ^1H -RMN para os produtos resultantes da reacção com o cloroformato de 4-nitrofenilo e na tabela 2.4, um resumo desses dados.

Tabela 2.4 – Dados espectroscópicos de ^1H -RMN dos derivados 4-nitrofenilo (**50**).

Composto (Substituinte em X)	NCH_3	ArMMT	ArNO_2
50a (CN)	3,62 (3H, s)	7,75-7,78 (4H, AA'BB', $J=9,2$ Hz)	7,45-8,33 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz)
50b (Br)	3,58 (3H, s)	7,56-7,60 (4H, AA'BB', $J=9,2$ Hz)	7,45-8,33 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz)
50c (CH_3)	3,57 (3H, s)	7,25-7,59 (4H, AA'XX', $J=8,4$ Hz)	7,45-8,32 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz)
50d (COCH_3)	3,61 (3H, s)	7,75-8,05 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz)	7,46-8,33 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz)
50e ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)	3,61 (3H, s)	7,73-8,14 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz)	7,47-8,34 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz)
50f (CONH_2)	3,61 (3H, s)	7,75-7,91 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz)	7,46-8,34 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz)

Os espectros destes compostos apresentam todos sinais comuns, nomeadamente: um singuleto a $\delta \approx 3,6$ ppm que corresponde ao grupo metilo do N3 do triazeno; um sinal corresponde ao anel aromático da metade do triazeno, característico pelo seu aspecto de par de dupletos, que se apresenta como um sistema AA'BB' ($\Delta\nu/J \leq 10$) ou AA'XX' ($\Delta\nu/J > 10$), com desvios químicos entre 7,25 e 8,14 ppm; e um sinal do anel aromático com o grupo NO_2 , sistema AA'XX', com desvios químicos entre 7,45 e 8,34 ppm. O substituinte do anel aromático do composto **50e** apresenta, para além dos já descritos na tabela, dois sinais correspondentes aos prótons do substituinte, um tripleto com $\delta \approx 1,4$ ppm e um quadripleto com $\delta \approx 4,4$ ppm, que correspondem ao CH_3 e ao CH_2 , respectivamente, e que acoplam entre si com uma constante de acoplamento $J = 7,2$ Hz.

Na figura 2.1 pode ver-se um exemplo do espectro de ^1H -RMN do composto **50a**.

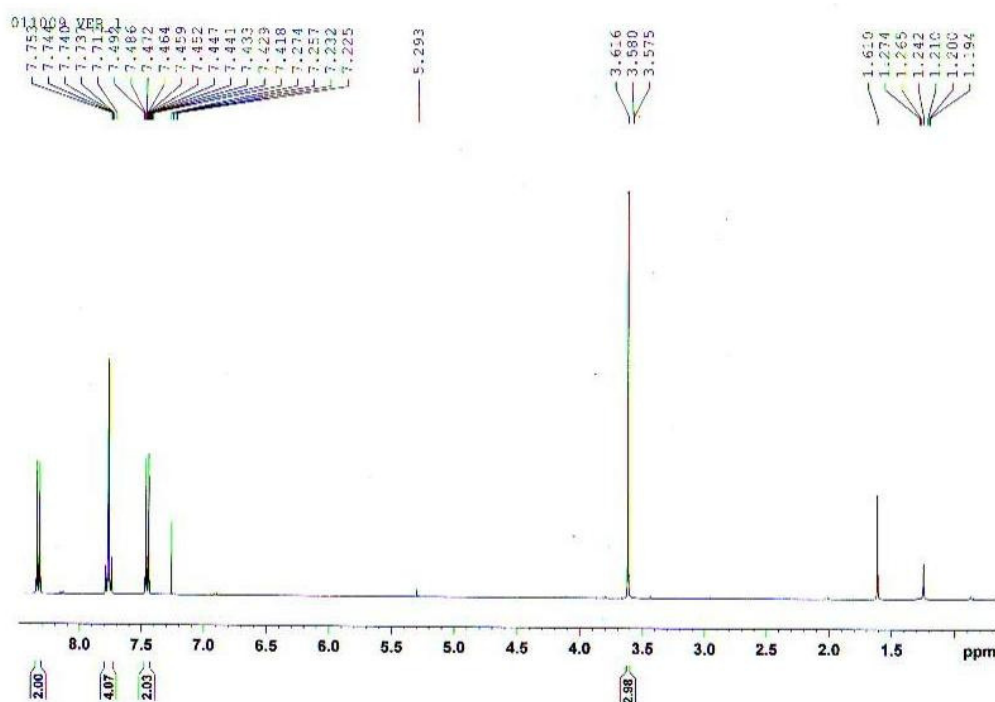
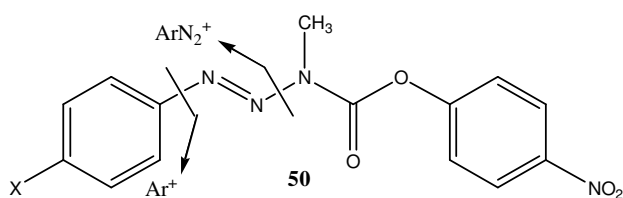


Figura 2.1 – Espectro de ^1H -RMN do composto **50a**.

Espectroscopia de Massa

Na tabela 2.5 encontram-se os picos mais representativos para os derivados 4-nitrofenilo (**50**) e no esquema 2.5 estão assinalados os principais pontos de fragmentação.



Esquema 2.5

Tabela 2.5 – Valores de m/z mais representativos da identificação estrutural dos derivados 4-nitrofenilo (**50**).

Composto (Substituinte em X)	M^+ (%)	$[\text{ArN}_2]^+$ (%)	$[\text{Ar}]^+$ (%)
50a (CN)	325 (10)	130 (83)	102 (100)
50b (Br)	378/380 (8/8)	185/183 (63/65)	157/155(98/100)
50c (CH_3)	314 (14)	119 (91)	91 (100)
50d (COCH_3)	342 (2)	147 (40)	119 (100)
50e ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)	372 (5)	177 (55)	149 (100)
50f (CONH_2)	-	148 (74)	120 (100)

Os fragmentos mais abundantes correspondem ao anel aromático da metade do MMT. O pico base destes derivados é predominantemente o ião Ar^+ . O ião ArN_2^+ é o segundo pico a surgir com relevância acentuada. É de notar que no caso do **50b** surgem dois picos moleculares de intensidade muito semelhante, o que se deve à presença de um átomo de halogéneo (Br) no anel aromático. O segundo destes picos (o menos abundante) surge devido à existência de um isótopo do Br ($M^+ + 2$)⁷⁴. O pico molecular por vezes não é visível ou aparece com baixa intensidade.

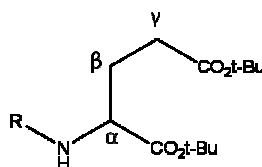
2.3.2 Caracterização dos Derivados Protegidos

Espectroscopia de ^1H -RMN

Na tabela 2.6 encontra-se um resumo dos valores dos desvios químicos (descritos na secção 4.6.3.1 do capítulo 4) obtidos nos espectros de ^1H -RMN para os pró-fármacos com o grupo Boc.

Pela observação da tabela 2.6 são de salientar alguns aspectos, como os sinais do grupo protector Boc, que aparecem como dois singuletos de grande intensidade a $\delta \approx 1,3$ e $1,5$ ppm.

No caso dos sinais dos grupos associados ao transportador ácido glutâmico (**56**) verifica-se que existem três multipletos com $\delta \approx 2,08$, $2,25$ e $2,40$ ppm para apenas dois grupos CH_2 . O que acontece é que os protões metilénicos $\beta\text{-CH}_2$, estando adjacentes a um centro quiral ($\alpha\text{-CH}$), não são magneticamente equivalentes. A estes protões dá-se o nome de diastereotópicos. Um dos protões do $\beta\text{-CH}_2$ absorve a $2,08$ e o outro a $2,25$ ppm, respectivamente. Para além disso, acoplam de formas diferentes com o $\alpha\text{-CH}$ ($J = 4,4$ Hz) e com o $\gamma\text{-CH}_2$ ($J = 7,6$ Hz) e ainda acoplam um com o outro ($J_{\text{gem}} = 6,8$ Hz). Quanto ao sinal do grupo $\alpha\text{-CH}$, esperava-se que aparecesse como um tripleto, contudo aparece como um multipeto, o que se deve ao facto de estar adjacente a protões diastereotópicos e de acoplar com o NH (que surge como um dupeto a $\delta \approx 7,3$ ppm). Também podia tratar-se de acoplamento à distância com o grupo $\gamma\text{-CH}_2$, no entanto, pelo espectro de Cosy verifica-se que não é o que acontece. Os sinais de acoplamento são apenas entre o sinal $\alpha\text{-CH}$ e os sinais do $\beta\text{-CH}_2$. O sinal do $\gamma\text{-CH}_2$ surge como um multipeto e não como um tripleto, como seria de esperar, igualmente devido à presença dos protões diastereotópicos no carbono adjacente ($\beta\text{-CH}_2$). Os espectros de ^{13}C -RMN também confirmam a estrutura dos compostos sintetizados.



56

Tabela 2.6 – Dados espectroscópicos de ^1H -RMN dos derivados com o grupo Boc (52).

Composto (Substituinte em X)	$(\text{CH}_3)_3$	CHCH_2CH_2	CHCH_2CH_2	NCH_3	CHCH_2CH_2	CONH	ArMMT
52a (CN)	1,36 (9H, s) 1,52 (9H, s)	2,09 (1H, m, $J=7,2$ Hz) 2,23 (1H, m, $J=4,4$ Hz)	2,41 (2H, m, $J=7,2$ Hz)	3,35 (3H, s)	4,53 (1H, m, $J=4,4$ Hz)	7,44 (1H, d, $J=7,6$ Hz)	7,74-7,77 (4H, AA'BB', $J=9,2$ Hz)
52b (Br)	1,42 (9H, s) 1,52 (9H, s)	2,07 (1H, m, $J=7,6$ Hz) 2,23 (1H, m, $J=4,4$ Hz)	2,40 (2H, m, $J=7,6$ Hz)	3,46 (3H, s)	4,55 (1H, m, $J=4,4$ Hz)	-	7,53-7,58 (4H, AA'BB', $J=9,2$ Hz)
52c (CH ₃)	1,43 (9H, s) 1,52 (9H, s)	2,06 (1H, m, $J=8$ Hz) 2,24 (1H, m, $J=4,8$ Hz)	2,39 (2H, m, $J=8$ Hz)	3,45 (3H, s)	4,57 (1H, m, $J=4,8$ Hz)	7,21 (1H, d, $J=8$ Hz)	7,25-7,54 (4H, AA'XX', $J=8,4$ Hz)
52d (COCH ₃)	1,42 (9H, s) 1,52 (9H, s)	2,08 (1H, m, $J=7,6$ Hz) 2,25 (1H, m, $J=4,4$ Hz)	2,40 (2H, m, $J=7,6$ Hz)	3,49 (3H, s)	4,55 (1H, m, $J=4,4$ Hz)	7,37 (1H, d, $J=7,6$ Hz)	7,72-8,06 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz)
52e (COOCH ₂ CH ₃)	1,45 (9H, s) 1,47 (9H, s)	2,05 (1H, m, $J=8$ Hz) 2,22 (1H, m, $J=4,4$ Hz)	2,38 (2H, m, $J=8$ Hz)	3,46 (3H, s)	4,53 (1H, m, $J=4,4$ Hz)	7,34 (1H, d, $J=8$ Hz)	7,68-8,12 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz)
52f (CONH ₂)	1,42 (9H, s) 1,51 (9H, s)	2,07 (1H, m, $J=7,6$ Hz) 2,24 (1H, m, $J=4,8$ Hz)	2,38 (2H, m, $J=7,6$ Hz)	3,38 (3H, s)	4,55 (1H, m, $J=4,8$ Hz)	7,34 (1H, d, $J=8$ Hz)	7,71-7,91 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz)

O sinal dos prótons do grupo NCH_3 surge em todos os derivados como um singuleto a 3,4 ppm aproximadamente.

O sinal dos prótons do anel aromático, que aparece como um sistema AA'BB' ou AA'XX', apresenta desvios químicos entre 7,25 e 8,12 ppm, concordantes com os obtidos no caso dos derivados 4-nitrofenilo.

No caso do **52e**, o sinal dos prótons do CH_3 do substituinte aromático que aparece a 1,4 ppm, aproximadamente, não é totalmente visível, uma vez que parte do tripleto está oculto pelos sinais do grupo Boc. Contudo, pelo cálculo da constante de acoplamento ($J = 7,2$ Hz) e pela correlação de Cosy, confirma-se que existe uma interação entre os grupos de prótons do substituinte ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).

Na figura 2.2 pode ver-se um exemplo do espectro de ^1H -RMN do composto **52d**.

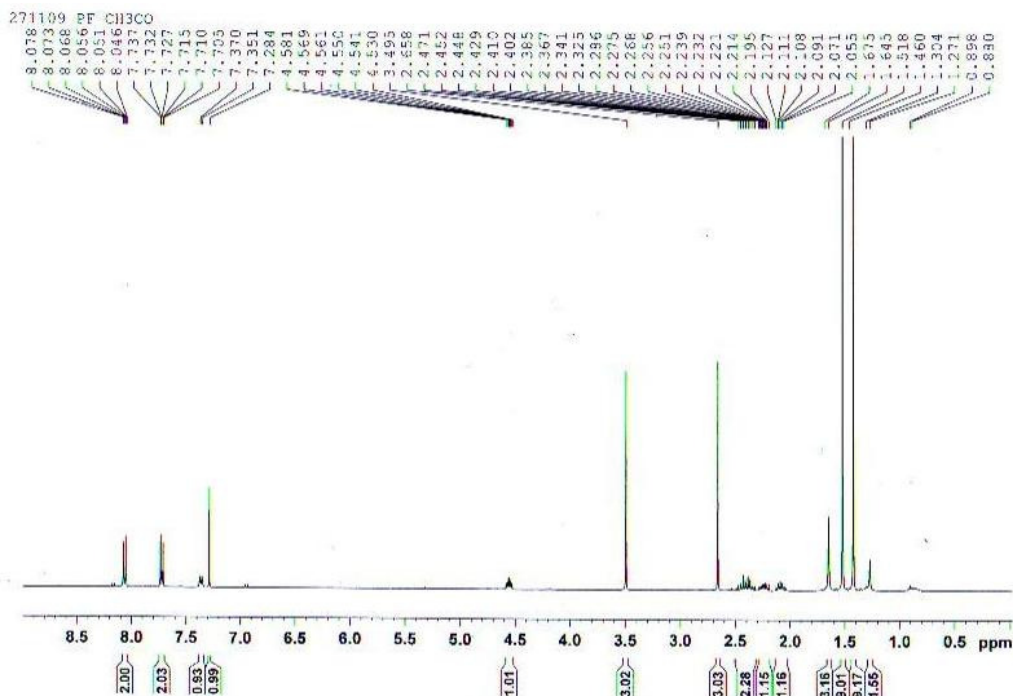
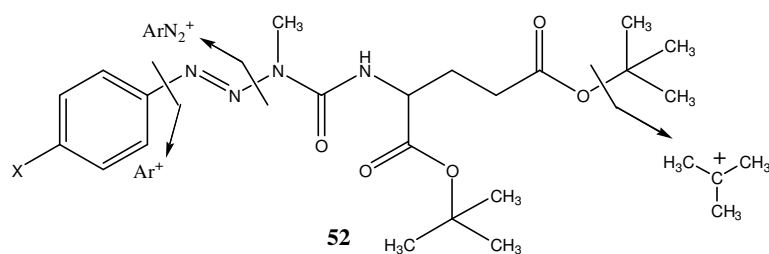


Figura 2.2 – Espectro de ^1H -RMN do composto **52d**.

Espectroscopia de Massa

De acordo com as fragmentações ilustradas no esquema 2.6, descrevem-se na tabela 2.7 os picos obtidos para os derivados com o grupo Boc e respectivas intensidades.



Esquema 2.6

O que se verifica para todos os derivados, excepto para o **52f**, é que o pico base corresponde ao carbocátion terciário resultante da fragmentação do grupo protector Boc, dada a sua elevada estabilidade. Com intensidade acentuada segue-se o ião ArN_2^+ e o ião Ar^+ , respectivamente. No caso do **52f**, observamos que o pico base corresponde ao ião resultante da fragmentação entre o aromático e o triazeno e que, dos picos mais destacáveis, o do

carbocatião terciário é o que apresenta menor intensidade. O pico molecular por vezes não é visível ou aparece com baixa intensidade.

Tabela 2.7 – Valores de m/z mais representativos da identificação estrutural dos derivados com o grupo Boc (**52**).

Composto (Substituinte em X)	M ⁺ (%)	[Ar] ⁺ (%)	[ArN ₂] ⁺ (%)	[(CH ₃) ₃] ⁺ (%)
52a (CN)	445,1 (1)	102 (60)	130 (76)	57 (100)
52b (Br)	500 (1) [*]	157/155 (26/26)	185/183 (42/34)	57 (100)
52c (CH ₃)	434 (3)	119 (50)	91 (82)	57 (100)
52d (COCH ₃)	462 (21)	119 (90)	147 (90)	57 (100)
52e (COOCH ₂ CH ₃)	492 (1)	177 (26)	149 (45)	57 (100)
52f (CONH ₂) [*] MH ⁺	-	120 (100)	148 (66)	57 (20)

2.3.3 Caracterização dos Derivados Ácido Glutâmico

Espectroscopia de ¹H-RMN

No capítulo 4, secção 4.6.4.1, estão descritos os valores obtidos nos espectros de ¹H-RMN dos pró-fármacos sintetizados, apresentando-se um resumo dos mesmos na tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Dados espectroscópicos de ¹H-RMN dos derivados ácido glutâmico (**49**).

Composto (Substituinte em X)	CHCH ₂ CH ₂	CHCH ₂ CH ₂	NCH ₃	CHCH ₂ CH ₂	ArMMT
49a (CN)	2,05 (1H, m) 2,38 (1H, m)	2,48 (2H, m)	3,02 (3H, s)	4,15 (1H, q)	8,15-8,89 (4H, AA'XX', J=9,2 Hz)
49b (Br)	2,08 (1H, m) 2,41 (1H, m)	2,51 (2H, m)	3,05 (3H, s)	4,17 (1H, q)	8,04-8,56 (4H, AA'XX', J=8,8 Hz)
49c (CH ₃)	2,05 (1H, m) 2,36 (1H, m)	2,45 (2H, m)	3,01 (3H, s)	4,23 (1H, q)	7,64-8,56 (4H, AA'XX', J=8,4 Hz)
49d (COCH ₃)	2,08 (1H, m) 2,37 (1H, m)	2,47 (2H, m)	3,02 (3H, s)	4,16 (1H, m)	8,34-8,81 (4H, AA'XX', J=8,4 Hz)
49e (COOCH ₂ CH ₃)	1,92 (1H, m) 2,15 (1H, m)	2,40 (2H, m)	3,04 (3H, s)	4,26 (1H, q)	8,43-8,82 (4H, AA'XX', J=8,4 Hz)
49f (CONH ₂)	1,96 (1H, m) 2,04 (1H, m)	2,37 (2H, m)	2,94 (3H, s)	4,14 (1H, q)	8,29-8,76 (4H, AA'XX', J=8,8 Hz)

Numa primeira análise, observa-se que o desvio químico relativo ao grupo NCH_3 aparece reprodutivelmente como um singuleto a $\delta \approx 3$ ppm. Comparativamente aos derivados com o grupo protector Boc, este sinal aparece a campo maior, o que tornou possível confirmar que o processo de desbloqueamento ocorreu como esperado, ou seja, que o produto não é o bloqueado.

Quanto ao sinal do anel aromático, surge para todos os derivados como um sistema AA'XX' com desvios químicos entre 7,64 e 8,81 ppm. Comparando estes valores com os dos derivados com o grupo Boc no ácido carboxílico, é de salientar que surgem a campo menor, o que também foi essencial na confirmação da reacção de desprotecção dos pró-fármacos. Para além disso, observa-se a existência de um sinal AA'XX' (com maior desvio químico) de muito baixa intensidade que se atribui ao anel aromático da amina que resulta de um processo de degradação. Na tabela 2.9 pode ver-se um resumo da eficácia da desprotecção dos vários compostos, calculado com base na quantidade de amina aromática presente no espectro de protão.

Tabela 2.9 – Resumo da eficácia da reacção de remoção do grupo Boc pelo TFA.

Composto (Substituinte em X)	Desprotecção (%)
49a (CN)	87,95
49b (Br)	93,58
49c (CH_3)	93,63
49d (COCH_3)	68,54
49e ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)	88,83
49f (CONH_2)	75,88

Relativamente aos sinais associados ao componente ácido glutâmico, revelou-se algo complicada a sua análise. O $\alpha\text{-CH}$ aparece como um quadripleto a $\delta \approx 4,2$ ppm, excepto no caso do **49e**, em que não é possível distinguir o quadripleto. Para além disso, a atribuição do sinal foi dificultada pelo facto do desvio químico se encontrar muito próximo dos valores a que surge o sinal dos protões do grupo CH_2 do substituinte aromático e também apareciam vários multipletos nessa zona, atribuíveis, muito provavelmente, a grupos de protões da amina aromática resultante da degradação pelo TFA. Comparativamente aos derivados com o grupo Boc (**52**), em que o sinal do protão $\alpha\text{-CH}$ surge como multiplete a $\delta \approx 4,5$ ppm, esta é também uma forma de distinguir estes derivados e confirmar a presença do composto desprotegido. Quanto ao sinal dos protões $\beta\text{-CH}_2$ e ao dos protões $\gamma\text{-CH}_2$ é possível apenas distingui-los e atribui-los a estes grupos de protões por recurso aos espectros de Cosy-RMN e por comparação com os espectros ^1H -RMN dos pró-fármacos com o grupo Boc, tendo em conta a

sua multiplicidade e a sua localização (desvio químico que apresentam). Em alguns dos multipletos do sinal dos prótons γ -CH₂ foi possível calcular as constantes de acoplamento (J), o que também confirmou que se tratava destes grupos de prótons.

Na figura 2.3 pode ver-se um exemplo do espectro de ¹H-RMN do composto **49c**.

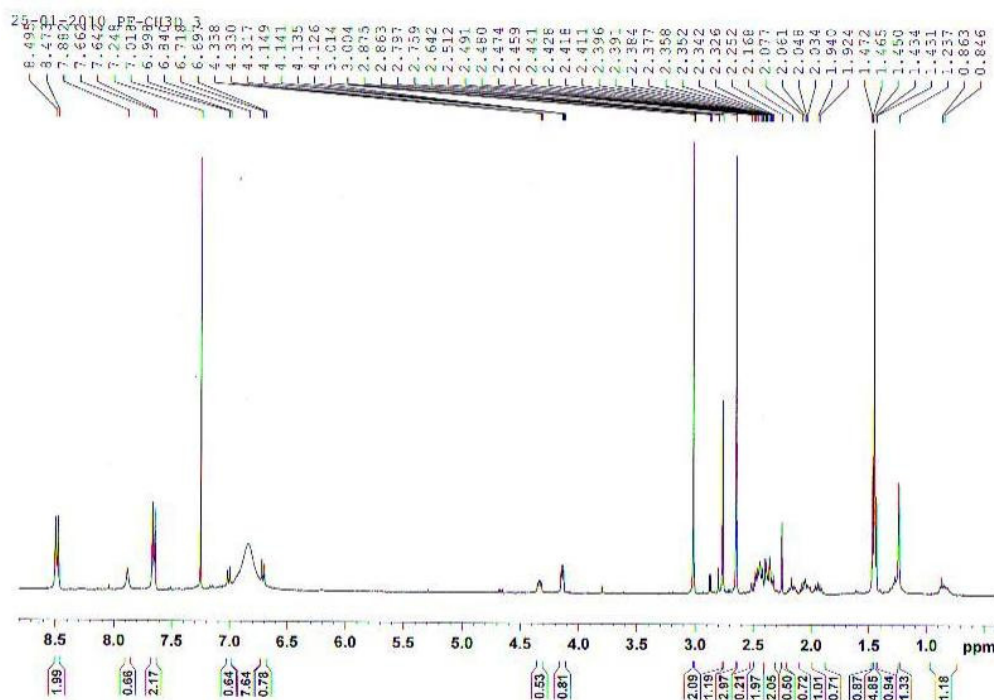


Figura 2.3 – Espectro de ¹H-RMN do composto **49c**.

Em alguns dos espectros, na zona compreendida entre os 2 e os 3 ppm (relativos aos prótons dos grupos metileno do ácido glutâmico) existe contaminação por diversos multipletos. Estes são de difícil atribuição e podem ser resultado de algum processo de degradação devido ao meio ácido em que ocorre a reacção de desprotecção, o que é confirmado pelo espectro de Cosy. Verifica-se que existem dois grupos de sinais correspondentes à interacção α -CH/ β -CH₂, correspondendo um deles à estrutura dos compostos **49** e o outro a uma estrutura resultante de um qualquer processo de decomposição.

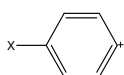
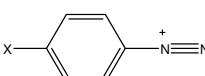
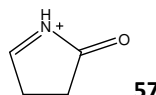
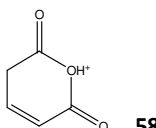
Os sinais relativos aos prótons dos grupos OH do ácido dicarboxílico não são visíveis nos espectros de ¹H-RMN, contudo os espectros de ¹³C-RMN confirmam a presença dos carbonos dos grupos ácido carboxílico.

Os produtos obtidos difíceis de secar na totalidade e, por isso, de um modo geral os espectros desses produtos nem sempre apresentavam uma boa resolução. Em relação a alguns dos derivados não foi possível observar todos os sinais nos respectivos espectros de ^{13}C -RMN.

Espectroscopia de Massa

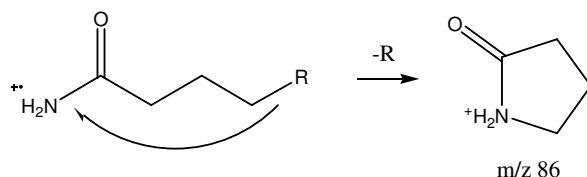
Da análise dos espectros de massa EI de modo positivo para os compostos **49** foi possível identificar um padrão de fragmentação comum a todos eles (tabela 2.10).

Tabela 2.10 – Valores de m/z mais representativos da identificação estrutural dos derivados ácido glutâmico (**49**).

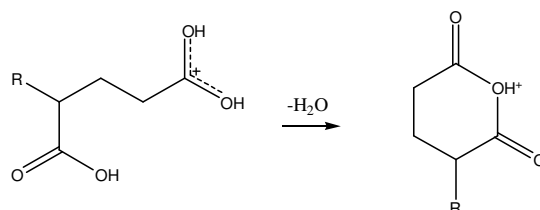
Fragmento (%)	X = CN	X = Br	X = CH ₃	X = COCH ₃	X = COOCH ₂ CH ₃	X = CONH ₂
M ⁺	333 (1)	-	322 (4)	-	-	-
	102 (6)	157 (13)	91 (22)	119 (3)	149 (12)	120 (66)
	130 (2)	185 (9)	119 (41)	147 (3)	177 (4)	148 (7)
 57	84 (13)	84 (100)	84 (82)	84 (74)	84 (64)	84 (100)
 58	113 (30)	113 (9)	113 (16)	113 (20)	113 (6)	113 (10)

Os picos facilmente identificáveis correspondem aos iões $[\text{ArN}]^+$ e $[\text{ArN}_2]^+$, como já acontecia com os derivados que lhes deram origem, e (por vezes) ao ião molecular, visível, mas de baixa intensidade. Estudos de fragmentação de vários ésteres di-alílicos de ácidos carboxílicos mostram que a intensidade relativa do pico do ião molecular depende do número de grupos carboxílicos presentes na molécula: quanto maior este número, menor a estabilidade (intensidade) do ião molecular⁷⁵. Para além destes, podem observar-se outros picos (estruturas **57** e **58**), comuns a todos os compostos, o que nos indica que só podem corresponder à metade não triazénica da estrutura. Pensa-se que os picos de m/z 84 e m/z 113 possam corresponder a estruturas cíclicas ($\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}$ e $\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_3$, respectivamente) resultantes do rearranjo de um fragmento formado durante uma qualquer fase da ionização⁷⁴. Apesar de não corresponderem a estruturas resultantes de um processo de fragmentação directo da molécula, pertencem a uma parte da mesma, o que nos ajuda a confirmar a estrutura dos compostos sintetizados. É de referir que o ião **57** é importante na medida em que corresponde

ao pico base de alguns dos compostos. Os processos de ciclização que muito provavelmente aconteceram assemelham-se aos apresentados no esquema 2.7 e 2.8. Segundo o esquema 2.8, assume-se que existe uma interacção entre os dois grupos ácido da molécula devido à conformação adoptada, que permite a eliminação de uma molécula de água e, consequentemente, a ciclização⁷⁴. Curiosamente, é de salientar que a estrutura do ião **57** se assemelha à estrutura cíclica **54** do esquema 2.4.



Esquema 2.7

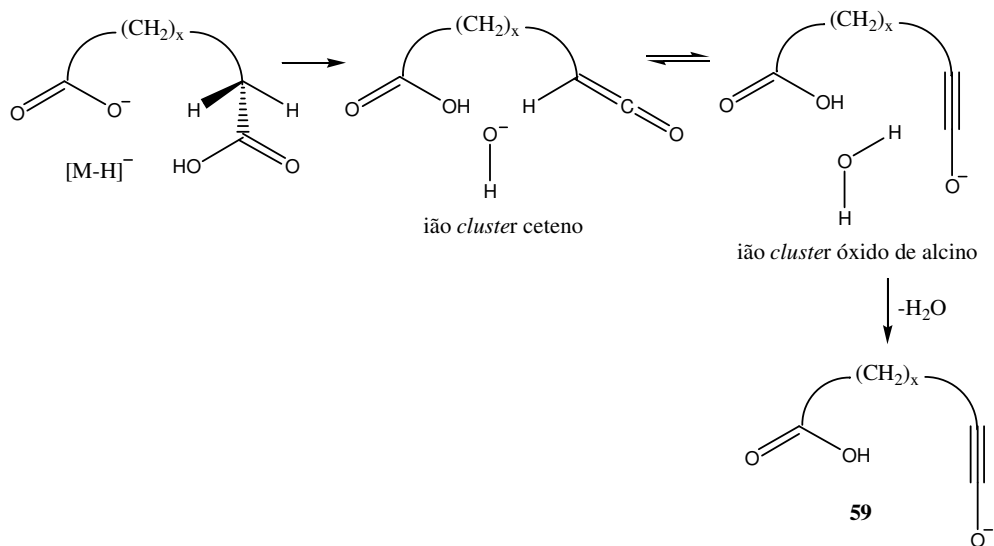


Esquema 2.8

Uma vez que a interpretação dos espectros EI de modo positivo dos pró-fármacos **49** se revelou algo difícil quanto às vias de fragmentação e quanto aos sinais encontrados, optou-se por estudar a fragmentação por impacto electrónico negativo do derivado **49c**.

Do espectro de massa ESI negativo do composto **49c** observa-se que não existe nenhum pico de m/z 321 correspondente ao ião molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$, como seria de esperar. Estudos anteriores sobre a fragmentação de ácidos dicarboxílicos de cadeia curta demonstraram que a formação do mono-anião é predominante, o que se deve à estabilização por pontes de hidrogénio intramoleculares entre os grupos carboxílicos ionizado e não-ionizado. Esta interacção é possível devido à conformação que a molécula adquire e que coloca os dois grupos funcionais próximos um do outro. Para que ocorra a ionização do segundo grupo ácido é necessária uma energia muito mais elevada que permita ultrapassar a estabilização conferida pela ligação hidrogénio intramolecular no mono-anião. A análise de uma série de espectros de massa ESI negativos de ácidos dicarboxílicos dissolvidos em metanol revelou que o pico m/z principal apresentava um valor que corresponde ao ião $[\text{M}-\text{H}]^-$, o que indica uma fácil formação do anião^{76,77}. Aparentemente, isto não aconteceu com o composto **49c**.

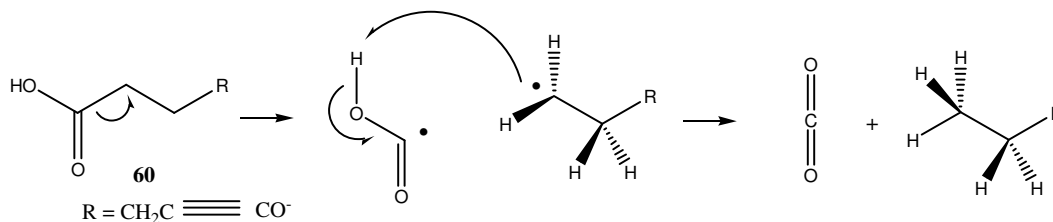
Contudo, há outros picos que podem ser identificados como resultado de fragmentações características de compostos dicarboxílicos (como é o caso do **49c**). De entre esses, encontramos um pico m/z bastante intenso de valor 303, que corresponde à perda de água (18 unidades de massa) a partir do íon $[M-H]^-$ (m/z 321). A m/z 259, observa-se que existe um pico de baixa intensidade, que se pode atribuir à eliminação de uma molécula de dióxido de carbono (44 unidades de massa) a partir do pico m/z 303. Segundo o padrão de fragmentação dos mono-aniões de ácidos carboxílicos, a perda, independente ou combinada, de água e de dióxido de carbono é um dos processos mais comuns. A perda de água resulta, geralmente, de uma fragmentação primária, facilitada por interações moleculares entre os grupos ionizado e não-ionizado e as propriedades dos aniões que se formam são consistentes com as estruturas na forma $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_x\text{C}\equiv\text{CO}^-$ (**59**), $x = 3 - 7$ ou 9. O mecanismo proposto (esquema 2.9) incorpora íões *cluster*. O produto da desidratação inicial do grupo ácido carboxílico não ionizado será um íon *cluster* contendo ceteno, mas este poderá prontamente sofrer transferência de próton para o íon *cluster* óxido de alcino, capaz de perder uma molécula de água. Por outro lado, este tipo de fragmentação também podia ser bimolecular e assistida pelo solvente^{76,77}. Assumindo que o pró-fármaco **49c** se comporta como uma molécula com $x = 3$, o padrão de fragmentação observado é coerente com esta observação.



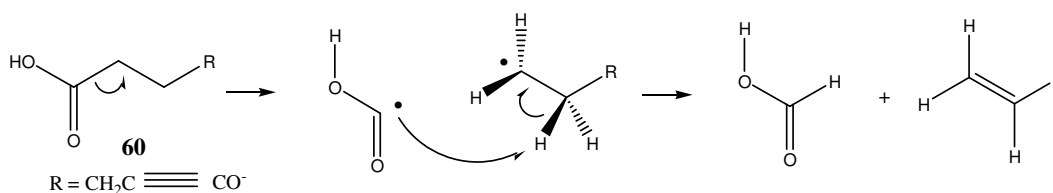
Esquema 2.9

Os estudos realizados por Grossert *et al* revelaram que a perda de uma molécula de CO_2 a partir do grupo ácido carboxílico não-ionizado tem maior importância para íões de estrutura $\text{HOOC}(\text{CH}_2)_x\text{CO}_2^-$ (íon $[M-H]^-$), em que $x \leq 4$. Quando $x > 4$, a perda de dióxido de carbono é

antecedida de uma perda inicial de água. Relativamente ao composto **49c** (em que se assume $x = 3$) este princípio parece não se aplicar, uma vez que se verifica a perda de CO_2 antecedida da perda de água, como proposto pelo esquema 2.10. A perda de duas moléculas de dióxido de carbono (88 unidades de massa) também era possível de acontecer, no entanto isso não se observou⁷⁷.



No espectro observa-se que existe um pico m/z 275 de baixa intensidade e que se pode atribuir à eliminação de ácido fórmico (HCO_2H , 46 unidade de massa) a partir do ião $[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z 321). Para além deste pico, verifica-se ainda a existência de um outro de baixa intensidade a m/z 257 e que podemos atribuir a $[\text{M}-\text{H}]^- - \text{H}_2\text{O} - \text{HCO}_2\text{H}$. Este tipo de fragmentação é outra das hipóteses possíveis nos ácidos dicarboxílicos de cadeia curta. No passo inicial origina-se o par de radicais, devido à clivagem homolítica da ligação C-C, que pode depois reagir por uma via que leva à formação de dois iões fragmento diferentes e, posteriormente, de duas espécies neutras (esquema 2.11).



Por último, é de referir que não se observam picos relativos à formação de aniões dímeros resultantes de interações intermoleculares (aductos intermoleculares), que teriam um pico m/z de aproximadamente 642. Também não se observam sinais relativos a iões aducto resultantes da associação dos iões formados por perda de água com moléculas do solvente utilizado, como o metanol, por exemplo.

2.4 Conclusões

Tendo em conta os resultados descritos neste capítulo, é possível concluir que foi possível efectuar a síntese, purificação e caracterização dos derivados triazénicos de ácido glutâmico.

Do esquema reaccional aplicado na sua obtenção, pode concluir-se que, no processo de activação do triazeno, por recurso ao cloroformato de 4-nitrofenilo, o composto **49f** (derivado amida) apresentou rendimentos bastante reduzidos, o que se deveu essencialmente a problemas de solubilidade. Os restantes compostos foram obtidos com rendimentos aceitáveis (aproximadamente de 50%), o que nos indica que o processo de activação do triazeno escolhido foi eficaz.

Pode concluir-se também que, a reacção de acoplamento do ácido glutâmico protegido nas funções ácido carboxílico aos MMT apresentou rendimentos bastante bons e o grau de purificação dos compostos obtidos foi de aproximadamente 100%.

Por último, conclui-se que, o processo de desprotecção das funções ácido carboxílico destes compostos é o mais problemático, devendo ser realizado com o maior rigor possível. A presença de anisol é essencial na reacção de desprotecção. A obtenção dos produtos finais sob a forma de óleos não permitiu a sua purificação e, consequentemente, comprometeu a realização das análises elementares dos pró-fármacos finais. Contudo, as restantes técnicas de identificação espectroscópica permitem-nos concluir que os compostos obtidos foram os pretendidos.

Capítulo 3

Avaliação dos Derivados de Ácido Glutâmico como Pró-Fármacos de Triazenos

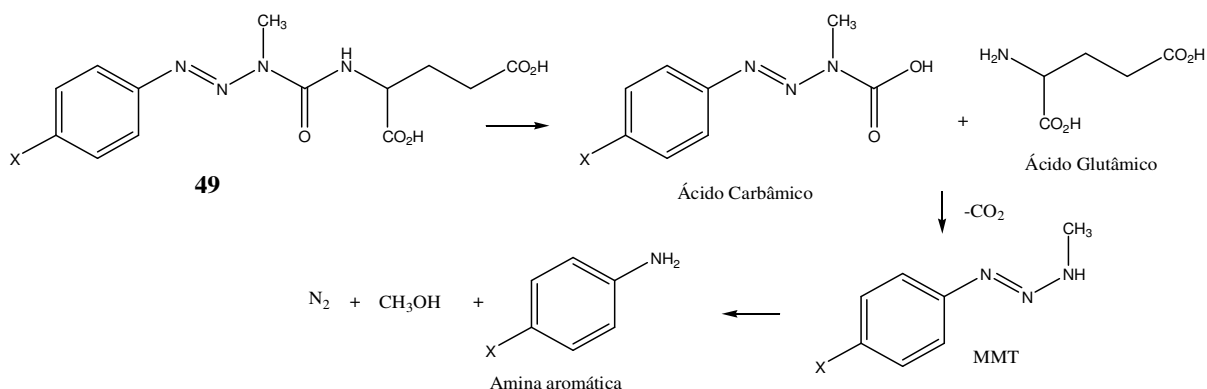
3.1 Introdução

Após confirmação estrutural dos derivados sintetizados **49**, de forma a avaliar o seu interesse como pró-fármacos, estudou-se a estabilidade em vários meios. Para os compostos **49a**, **49b**, **49c** e **49e**, apresentam-se neste capítulo estudos de hidrólise química em tampão fosfato (0,01 M, pH 7.4), estudos de hidrólise em plasma humano e estudos de hidrólise na presença de albumina humana, a 37°C. Por último, apresentam-se os estudos de hidrólise dos compostos **49a** e **49e** na presença de enzima CPG2, a 30°C. Estes estudos cinéticos elucidaram-nos relativamente à estabilidade dos compostos em condições semelhantes às fisiológicas, à sua afinidade para a CPG2 e à eficácia de libertação do agente citotóxico – o MMT – quando expostos a esta enzima.

3.2 Hidrólise Química dos Derivados Ácido Glutâmico

3.2.1 Produtos de Hidrólise

Os compostos triazénicos **49** quando se hidrolisam em meio aquoso formam os respectivos MMT. Quando o pH > 7, a identificação do MMT como produto de hidrólise é possível. Contudo, quando o pH < 7, o MMT decompõe-se instantaneamente na correspondente amina aromática (esquema 3.1)⁷⁸. Assim, nos estudos de hidrólise química é possível observar a presença de MMT e da respectiva amina aromática. Os produtos de hidrólise foram identificados e quantificados no final da reacção, por espectroscopia de UV ou por HPLC.



Esquema 3.1

De forma a determinar qual o comprimento de onda ideal para a monitorização dos ensaios cinéticos por HPLC, traçaram-se espectros de UV, de onde se retiraram os valores de c.d.o. para os quais a absorvância era máxima. Esses valores estão descritos na tabela 3.1. Passada uma hora, fez-se nova leitura da absorvância dos compostos, de forma a perceber quão rápido era o desaparecimento do substrato e, conseqüentemente, se era viável o estudo da sua hidrólise em tampão fosfato por HPLC a 37°C. Foram feitas leituras de hora a hora até à infinidade da reacção.

Tabela 3.1 – Comprimentos de onda máximos dos derivados ácido glutâmico (**49**) obtidos por espectroscopia de UV em tampão fosfato isotónico pH 7.4, à temperatura ambiente.

Composto (Substituinte em X)	c.d.o. máximo (nm)	Abs _{t0} → Abs _{t1} → Abs _{t∞}
49a (CN)	269	0,25 → 0,18 → 0,12
49b (Br)	291	0,22 → 0,19 → 0,09
49c (CH ₃)	278	0,52 → 0,52 → 0,05
49d (COCH ₃)	270	0,28 → 0,17 → 0,17
49e (COOCH ₂ CH ₃)	265	0,51 → 0,47 → 0,28
49f (CONH ₂)	260	0,09 → 0,07 → 0,06

Como se pode observar da tabela 3.1, o valor de absorvância dos compostos **49d** e **49f** ao final de uma hora (Abs_{t1}) difere muito pouco do valor de absorvância observado na infinidade (Abs_{t∞}). Isto indica-nos que a decomposição total do pró-fármaco na amina correspondente ocorre muito rapidamente e, portanto, assumimos que não era possível realizar o estudo da sua hidrólise química em tampão fosfato por HPLC com a precisão pretendida. Para os restantes derivados, verifica-se que, passada uma hora, a concentração de pró-fármaco se mantém muito próxima da inicial e que o seu desaparecimento total leva mais tempo. A estabilidade destes compostos foi então estudada por HPLC.

3.2.2 Resultados e Discussão do Estudo Cinético da Hidrólise em Tampão Fosfato

O estudo da hidrólise dos compostos **49a**, **49b**, **49c** e **49e** em tampão fosfato isotónico (0,01M, pH 7.4), a 37°C, foi feito por HPLC. Consoante os compostos a serem estudados e o tempo de retenção obtido para cada um, a proporção entre a fase orgânica e a fase aquosa do eluente foi variável (capítulo 4, tabela 4.4). Numa fase inicial do trabalho, tentou fazer-se a determinação da estabilidade química por HPLC num sistema de eluição isocrática com acetato de amónio (pH 5) e diferentes percentagens de metanol (fase móvel)⁴⁶. Contudo, revelou ser impossível a separação do pró-fármaco do MMT ou da amina correspondente. Tentou-se ainda

a eluição com água e metanol, mas foi também impossível obter tempos de retenção suficientemente diferentes entre o substrato e os produtos da reação. Na tentativa de encontrar um eluente que, independentemente do pH que confere ao meio, tem a capacidade de estabilizar o pró-fármaco, permitindo a sua separação do MMT ou da correspondente amina, estudou-se a estabilidade dos compostos num sistema isocrático constituído por uma fase móvel de acetonitrilo e por tampão hidrogenofosfato de tetrabutilamónio (TBAH). Este sistema revelou ser o mais adequado ao estudo da hidrólise química dos compostos sintetizados.

Através da análise cromatográfica seguiu-se o desaparecimento do substrato e o aparecimento dos produtos de reação, que foram identificados por comparação com os respectivos padrões. Para os compostos **49a** e **49c** (figura 3.1), identificaram-se como produtos de hidrólise os respectivos MMT, os quais se decompõem posteriormente nas anilinas correspondentes (esquema 3.1). Contudo, devido à decomposição imediata do MMT na respectiva amina, a visualização do seu aparecimento não foi possível para todos os derivados, como é o caso do **49b** e do **49e** (tabela 3.2).

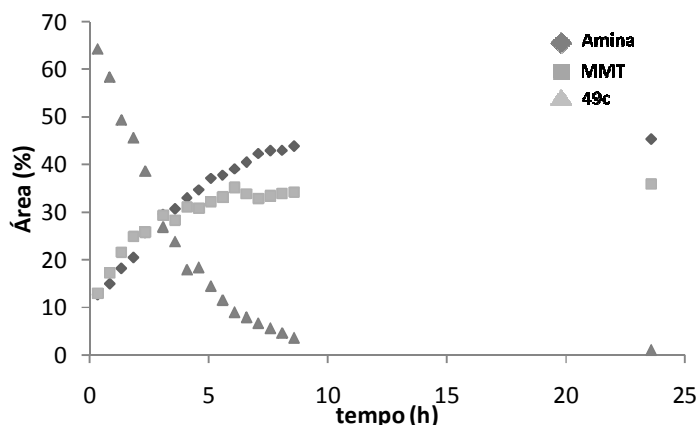


Figura 3.1 – Evolução relativa das espécies na hidrólise do composto **49c**, em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, seguida por HPLC a 278 nm.

Analisando os dados da tabela seguinte, verifica-se que existe uma relação entre os vários componentes. Observa-se a diminuição do pico do pró-fármaco, à medida que aumenta o pico do MMT ou da amina. Nos casos em que é possível quantificar o MMT, verifica-se que numa fase inicial tende a aumentar, acabando depois por diminuir até estabilizar ou até desaparecer.

Tabela 3.2 – Percentagens da área dos substratos (**49**) e respectivos produtos de reacção em diferentes tempos, obtidas por HPLC em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C.

Composto (Substituinte em X)	Produto			
	tempo (h)	PF (%)	MMT (%)	Amina (%)
49a (CN)	0	83,06	6,39	10,56
	2,67	44,74	22,65	32,61
	22,85	23,15	38,6	38,25
	165,93	10,53	-	89,48
49b (Br)	0	84,27	-	15,73
	4	47,29	-	52,71
	4,84	32,64	-	67,36
	26,51	6,02	-	80,60
49c (CH ₃)	0	64,31	18,32	19,37
	2,41	33,35	33,13	33,52
	4,16	13,69	38,46	42,37
	46,75	4,38	36,54	59,08
49d (COOCH ₂ CH ₃)	0	83,33	-	7,94
	2	42,68	-	24,99
	3,76	14,22	-	45,09
	70,93	11,42	-	57,92

Os valores das constantes de velocidade de pseudo 1^a ordem (k_{obs}) foram determinados a partir dos gráficos de \ln Área em função do tempo (t), de acordo com a equação 3.1 (capítulo 4, figura 4.4).

$$\ln(\text{Área}) = -k_{obs} \times t \quad (3.1)$$

A estabilidade dos compostos pode também ser expressa em tempo de semi-vida, ou seja, o tempo necessário para que a concentração se reduza a metade, e, para isso, utilizou-se a equação 3.2.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{obs}} \quad (3.2)$$

Na tabela 3.3 estão descritos os valores de k_{obs} e de $t_{1/2}$ determinados.

Tabela 3.3 – Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de $t_{1/2}$, obtidos por HPLC em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C, dos compostos **49**.

Composto (Substituinte em X)	k_{obs} (h ⁻¹)	$t_{1/2}$ (h)	R ²
49a (CN)	0,3201	2,17	0,9206
49b (Br)	0,1893	3,66	0,9883
49c (CH ₃)	0,0909	7,63	0,9951
49e (COOCH ₂ CH ₃)	0,2393	2,89	0,9724

Observando os dados da tabela anterior, verifica-se que os compostos se decompõem num meio de pH 7.4 e a 37°C com semi-vidas que oscilam entre 2h10min e 7h40m, ou seja, em condições fisiológicas, alguns destes compostos são relativamente instáveis. O composto que revelou ser mais estável é o **49c**.

Influência da Estrutura do Substituinte no Anel Aromático da Metade Triazénica

A correlação de Hammett compara o efeito electrónico do substituinte (σ) na reactividade de um determinado composto com o efeito desse mesmo substituinte numa reacção padrão.

Durante este trabalho não foram realizados estudos específicos que permitissem determinar o efeito do substituinte no anel aromático. No entanto, recorrendo aos valores do tempo de semi-vida determinados em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, para os compostos **49a**, **49b**, **49c** e **49e** e aos parâmetros do substituinte em *para* de cada um (σ_p = 0,66; 0,23; -0,17; 0,45, respectivamente) é possível elaborar um gráfico de Hammett (figura 3.2).

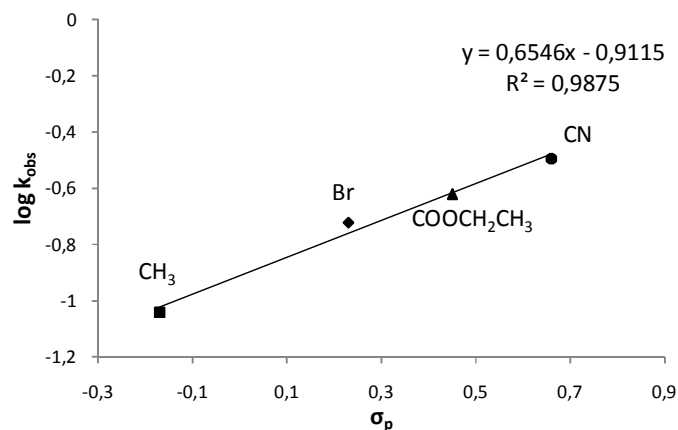
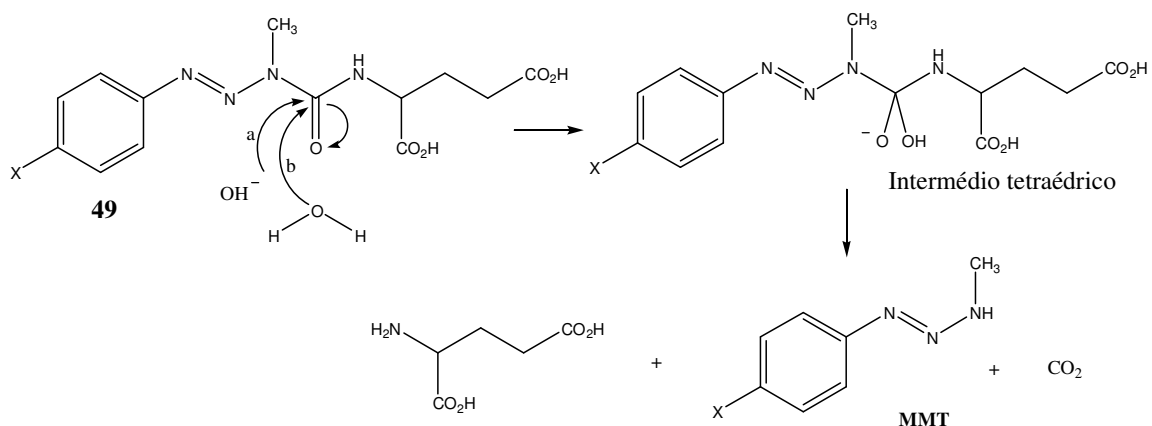


Figura 3.2 – Gráfico de Hammett dos tempos de semi-vida para a decomposição dos compostos **49** em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C contra os valores de σ_p dos respectivos substituintes.

Na figura 3.2 pode observar-se que existe uma boa correlação ($R^2 \approx 0,99$) entre os valores de $\log k_{obs}$ e os valores das constantes de Hammett (σ_p). A relação linear obtida, cujo declive (constante de reacção, ρ) deu aproximadamente 0,65, indica-nos que a reacção de hidrólise dos compostos **49** é acelerada por grupos electroattractores. Este valor não é muito elevado, uma vez que é grande a distância do substituinte X ao centro reactivo.

Com base nos produtos que resultam da hidrólise em meio aquoso e no valor de ρ positivo, consistente com um mecanismo de adição-eliminação, envolvendo a formação de um intermédio tetraédrico com carga negativa e, como tal, estabilizada por grupos electroattractores, propõe-se o seguinte mecanismo para a hidrólise destes compostos (esquema 3.2).



Esquema 3.2

Uma vez que se verificou não ser exequível o estudo da estabilidade dos compostos **49d** e **49f** por HPLC, optámos por determinar a constante de velocidade k_{obs} e o tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, recorrendo à espectroscopia de UV (capítulo 4, secção 4.7.1). Os valores obtidos estão descritos na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de $t_{1/2}$, obtidos por espectroscopia de UV em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C, dos compostos **49**.

Composto (Substituente em X)	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	R^2
49d (COCH_3)	0,2716	2,55	0,9938
49f (CONH_2)	0,1078	6,43	0,9846

Por análise da tabela, é possível conferir que, em condições fisiológicas, a hidrólise dos pró-fármacos **49d** e **49f** é quase imediata. Estes compostos serão, por isso, demasiado instáveis para desenvolver como pró-fármacos.

3.3 Hidrólise dos Derivados Ácido Glutâmico em Plasma Humano

O plasma humano contém uma série de enzimas capazes de catalisar a hidrólise dos derivados ureia^{26,66}. Para avaliar a susceptibilidade dos compostos **49a**, **49b**, **49c** e **49e** à hidrólise por acção das enzimas plasmáticas, procedeu-se ao estudo da sua estabilidade em plasma humano, diluído a 80% (v/v) com tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C. As reacções foram monitorizadas por HPLC, recorrendo-se à mesma técnica utilizada nos ensaios em tampão fosfato, ou seja, ao desaparecimento do substrato e ao aparecimento dos produtos da

reacção. Contudo, os resultados obtidos não coincidiram com os esperados. Por observação dos cromatogramas verificámos que o pico correspondente ao substrato não aparecia, o que estava a acontecer, muito provavelmente, porque o composto se ligava às proteínas do plasma. Assim, em vez de se encontrar no sobrenadante retirado para injeção no cromatógrafo, encontrava-se no precipitado que se forma após a desnaturação das proteínas plasmáticas e da centrifugação. Na tentativa de ultrapassar este problema, aumentou-se a concentração de pró-fármaco e diminuiu-se a quantidade de acetonitrilo utilizado para desnaturação das proteínas. No entanto, o pico do substrato continuava a não aparecer.

Durante a realização destes estudos constatou-se que, quando se recolhia a amostra para injeção no HPLC o mais próximo possível do precipitado, o pico do substrato aparecia nos cromatogramas. Para além disso, verificou-se ainda que quando não se agitava a mistura reaccional no vortex antes da centrifugação, o pico do substrato também era visível. No entanto, fazer os ensaios de estabilidade com base nestas observações não era uma solução a considerar, uma vez que o processo de recolha das amostras não seria reprodutível de ensaio para ensaio e que o erro associado seria elevado. Para além disso, quando o sobrenadante era recolhido junto ao precipitado, os cromatogramas estavam contaminados com picos que, provavelmente, correspondiam a componentes do plasma. Tal dificultaria a identificação precisa dos picos do substrato e dos produtos da reacção. Estas observações levantaram a hipótese de que poderá realmente existir uma forte ligação dos compostos às proteínas plasmáticas, sendo este um processo de equilíbrio, no qual essa ligação é reversível. Posto isto, é possível até que a ligação às proteínas plasmáticas funcione como protecção à degradação dos compostos até que estes alcancem o seu local de acção. Estão referenciadas algumas situações em que a ligação à albumina desempenha um papel de protecção em relação à hidrólise dos fármacos, nomeadamente a hidrólise do anel de lactona das canfocetinas (classe de agentes anti-cancerígenos) e a hidrólise espontânea da aspirina, que decresce na presença de albumina. Relativamente a derivados triazénicos, existem também evidências de que os compostos se ligam à albumina humana e de que esta os protege da degradação química^{64,79,80,81}.

Outro dos procedimentos utilizados para tentar estudar a estabilidade dos compostos **49** na presença de proteínas plasmáticas passou por utilizar plasma humano diluído a 20% (v/v) com tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C. Os resultados obtidos foram semelhantes aos anteriores, ou seja, o pico do substrato não era visível nos cromatogramas.

Apesar dos resultados obtidos, decidiu-se continuar a retirar alíquotas em intervalos de tempo regulares para verificar se havia um aumento do pico do MMT ou da amina. Na tabela 3.5 podem ver-se os resultados destes ensaios. As reacções foram seguidas a partir do valor da

altura (e não da área) dos picos, uma vez que os cromatogramas apresentavam muito má definição e que a quantificação do aumento dos picos pela área era inconclusiva. Recorrer ao registo do aumento da altura ao longo do tempo pareceu ser, por isso, a opção mais correcta.

Tabela 3.5 – Valores da altura dos picos dos compostos **49** ao longo do tempo nos ensaios cinéticos em plasma humano, a 37°C.

Composto (Substituinte em X)	Altura do pico da amina aromática (mAU)							
49a^a (CN)	t ₀ (0h) 4	t ₂ (0,1h) 6	t ₃ (0,2h) 8	t ₄ (0,3h) 10	t ₆ (0,7h) 14	t ₇ (1h) 30	t ₉ (2,6h) 36	t ₁₄ (47,6h) 48
49e^b (COOCH ₂ CH ₃)	t ₀ (0h) 6		t ₁ (0,3h) 21		t ₂ (0,5h) 26		t ₄ (18,5h) 41	

^a – Ensaios realizados em plasma humano diluído a 80% (v/v)

^b – Ensaios realizados em plasma humano diluído a 20% (v/v)

Para os compostos **49a** e **49e**, foi possível observar um aumento da altura do pico da respectiva amina em plasma humano ao longo do tempo. Relativamente ao **49e**, isso só foi possível com uma solução de plasma mais diluída, o que nos indica que realmente é provável que haja uma ligação às proteínas do plasma, pois diminuindo a sua concentração é possível observar o aparecimento dos produtos de hidrólise. No entanto, o pico do substrato nunca se vê e, por isso, não se conseguiu calcular o tempo de semi-vida dos compostos em plasma humano. Esses valores, por comparação com os tempos de semi-vida em tampão fosfato, permitiriam confirmar se os compostos são substratos das enzimas do plasma. Caso o $t_{1/2}$ em plasma fosse igual ou superior ao $t_{1/2}$ em tampão fosfato, podia concluir-se que os compostos não eram substrato das enzimas plasmáticas.

Curiosamente, é de referir que não se encontraram descritos na literatura quaisquer estudos de estabilidade em plasma humano, semelhantes aos realizados neste trabalho, de pró-fármacos substratos da CPG2 contendo ácido glutâmico como transportador, como é o caso das mostardas de azoto ou das antraciclina^{43,44,46,82}.

Antoniw *et al*⁸³ realizaram um estudo no qual determinaram a distribuição do pró-fármaco ácido 4-[bis(2-cloroetil)amino]benzoil-L-glutâmico (**8**) e do respectivo fármaco activado (mostarda de ácido benzóico) no plasma e nos tecidos, após administração intraperitoneal ou intravenosa em ratos xenotransplantados portadores de coriocarcinoma humano. Os autores verificaram que a activação do pró-fármaco no plasma é um processo muito lento, uma vez que o fármaco activo só é visível 2 horas depois da injeção e em quantidades reduzidas. Verificaram também que quando havia administração prévia do CEA, era possível detectar o fármaco activo no plasma 5 minutos depois da injeção. Os autores

concluíram que a activação do pró-fármaco no plasma se devia aos níveis residuais de CEA aí presentes. Quanto à activação do pró-fármaco no tecido tumoral, onde os níveis de actividade enzimática são superiores, verificaram que a quantidade de fármaco activo não era a maior quando comparada com a do plasma e a dos restantes tecidos. Para além disso, o estudo da distribuição do pró-fármaco demonstrou que é nos tecidos tumorais que os seus níveis são mais baixos. Contudo, só mesmo no tumor é que a conversão enzimática do pró-fármaco no fármaco activo foi total. Observaram ainda que no plasma e nos tecidos normais a enzima não activava toda a quantidade de pró-fármaco presente nestes locais. Assim, concluiu-se que a incapacidade da enzima presente no plasma em activar a totalidade de pró-fármaco disponível se devia aos baixos níveis de enzima e aos altos níveis de pró-fármaco. Por outro lado, tendo em conta que a ligação do pró-fármaco e do fármaco às proteínas plasmáticas (confirmada pelos autores) era quase total, sendo de 92% e 96%, respectivamente, estes factos podem ser avaliados numa outra perspectiva. Ou seja, devido à ligação às proteínas plasmáticas, a quantidade do pró-fármaco capaz de alcançar os tecidos tumorais é bastante reduzida e a dificuldade da CPG2 em hidrolisá-lo no plasma deve-se, não à baixa quantidade de enzima, mas sim ao facto de o composto se encontrar ligado às proteínas plasmáticas. Estes resultados podem ser um reflexo do que acontece com os compostos **49** estudados em plasma humano neste trabalho.

Uma vez que os resultados dos estudos em plasma humano se revelaram inconclusivos quanto à acção das enzimas plasmáticas sobre a hidrólise dos derivados ácido glutâmico, realizaram-se de seguida ensaios de estabilidade na presença de albumina humana, com o objectivo de avaliar como interagem estes compostos com as proteínas do plasma.

3.3.1 Hidrólise dos Derivados Ácido Glutâmico na Presença de Albumina Humana

A albumina é a proteína mais abundante do plasma nos sistemas mamíferos. Ao contrário das outras proteínas plasmáticas, que tendem a exercer uma única função específica, a albumina desempenha um papel extremamente importante em numerosas actividades fisiológicas. Nomeadamente, no transporte e na deposição de uma grande variedade de substâncias endógenas e exógenas, como ácidos gordos, triptofano, hormonas, iões, fármacos (geralmente ácidos ou neutros) e seus metabolitos. A ligação a estes agentes ocorre normalmente através de ligações não-covalentes (reversíveis). A elevada flexibilidade da albumina, juntamente com uma distribuição diferencial de carga ao longo da molécula, tornam possível a ligação de diversas classes de compostos caracterizados por apresentarem

estruturas muito diferentes. Compostos aniônicos hidrofóbicos são os que se ligam mais fortemente à albumina^{79,84,85,86}. Sabendo que a albumina humana, com peso molecular de 66,5 kDa⁸⁷, está presente no sangue com uma concentração de 3200 a 5600 mg/cm³, preparou-se uma gama de soluções em tampão fosfato isotónico de concentrações maiores e menores que os valores plasmáticos normais. Posteriormente, determinou-se a velocidade de hidrólise do composto nas várias soluções a 37°C. Os ensaios foram monitorizados por HPLC, de forma semelhante aos ensaios realizados em plasma humano, observando-se o desaparecimento do substrato e o aparecimento dos produtos da reacção.

3.3.1.1 Resultados e Discussão do Estudo Cinético da Hidrólise na Presença de Albumina Humana

Com o objectivo de perceber qual o efeito da concentração de albumina sobre os compostos **49**, avaliou-se o seu comportamento (altura do pico) perante o aumento da concentração desta proteína. Na tabela 3.6 podem ver-se os resultados obtidos. Os produtos de hidrólise são os MMT que, nas condições do ensaio, se decompõem na respectiva amina aromática. Nos compostos **49b** e **49e** não se vê o pico do MMT.

Tabela 3.6 – Valores das alturas dos picos dos derivados ácido glutâmico (**49**) e respectiva amina, obtidos por HPLC na presença de albumina humana em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C.

Composto (Substituinte em X)	Altura (mAU)			
	[Albumina] M	PF	Amina	MMT
49a (CN)	5x10 ⁻⁷	24	32	42
	1x10 ⁻⁶	22	32	30
	5x10 ⁻⁵	15	43	-
49b (Br)	5x10 ⁻⁷	56	7	-
	5x10 ⁻⁶	47	5	-
	1x10 ⁻⁵	38	6	-
	5x10 ⁻⁵	25	6	-
	2x10 ⁻⁴	8	6	-
49c (CH ₃)	5x10 ⁻⁷	28	16	12
	1x10 ⁻⁶	18	16	11
	6x10 ⁻⁴	10	20	12
	8x10 ⁻⁴	1	22	13
49e (COOCH ₂ CH ₃)	5x10 ⁻⁷	33	17	-
	1x10 ⁻⁶	30	18	-
	5x10 ⁻⁶	17	17	-
	1x10 ⁻⁵	16	17	-
	5x10 ⁻⁵	9	18	-

Observando a tabela 3.6, confirma-se que os compostos se ligam às proteínas plasmáticas, uma vez que, em tempo zero ($t = 0\text{min}$), quanto maior a concentração de albumina, menor a quantidade de composto **49** em solução. Para além disso, a quantidade de amina não varia muito com o aumento dessa concentração. Verificou-se também que, para concentrações de albumina mais elevadas, a visualização do pró-fármaco só é possível em t_0 , pois quando se vai analisar a alíquota recolhida poucos minutos depois, já não surge nenhum pico onde deveria aparecer o do pró-fármaco. Para concentrações próximas da concentração máxima encontrada no organismo ($8,12 \times 10^{-4}\text{ M}$), nem em tempo zero se consegue observar o substrato. Estes resultados indicam-nos que a afinidade dos compostos **49** para a albumina humana é consideravelmente elevada. É de salientar que o composto **49a**, no início da reacção, aparece em menor quantidade que os correspondentes MMT ou amina, o que nos pode indicar que este composto se liga mais fortemente à albumina.

Confirmada a afinidade de ligação dos derivados ácido glutâmico à albumina humana, fez-se o estudo do efeito da concentração de albumina sobre a velocidade de hidrólise destes derivados. Na tabela 3.7 encontram-se os valores das constantes de velocidade e dos tempos de semi-vida obtidos (determinados através das equações 3.1 e 3.2).

Tabela 3.7 – Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de $t_{1/2}$, obtidos por HPLC na presença de albumina humana em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C , dos compostos **49**.

Composto (Substituinte em X)	[Albumina] M	k_{obs} (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)	R^2
49a (CN)	5×10^{-7}	0,0117	59,24	0,9608
	1×10^{-6}	0,0357	19,42	0,9217
49b (Br)	5×10^{-6}	0,0067	103,45	0,9873
	1×10^{-5}	0,0092	75,34	0,9914
	5×10^{-5}	0,0535	12,96	0,9544
49c (CH_3)	5×10^{-7}	0,0117	58,99	0,9718
	1×10^{-6}	0,0135	51,46	0,9409
49e ($\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)	5×10^{-7}	0,0109	63,71	0,9703
	1×10^{-6}	0,9361	44,43	0,9876
	5×10^{-6}	0,067	10,35	0,9761

Da análise da tabela anterior, verifica-se que a velocidade de hidrólise dos compostos **49** na presença de albumina humana aumenta à medida que aumenta a sua concentração. Assim, podemos deduzir que a decomposição destes compostos é catalisada pela albumina (proteína plasmática). Para os compostos **49a**, **49c** e **49e**, a velocidade de decomposição na presença de albumina humana $5 \times 10^{-7}\text{ M}$ é muito semelhante e cerca de duas vezes inferior à do **49b**. Este composto é o mais estável, seguindo-se o **49c**, ao contrário do que acontecia em tampão fosfato. Por comparação dos tempos de semi-vida obtidos para a menor concentração de

albumina humana com os tempos de semi-vida obtidos em tampão fosfato, verifica-se que a estabilidade dos compostos diminui consideravelmente na presença desta proteína plasmática. Na figura 3.3 pode ver-se um exemplo dessa situação. No entanto, não existe nenhuma correlação na velocidade de hidrólise nos dois meios (figura 3.4). Consequentemente, não existe também correlação entre os substituintes no anel aromático e a velocidade da hidrólise em soluções de albumina humana.

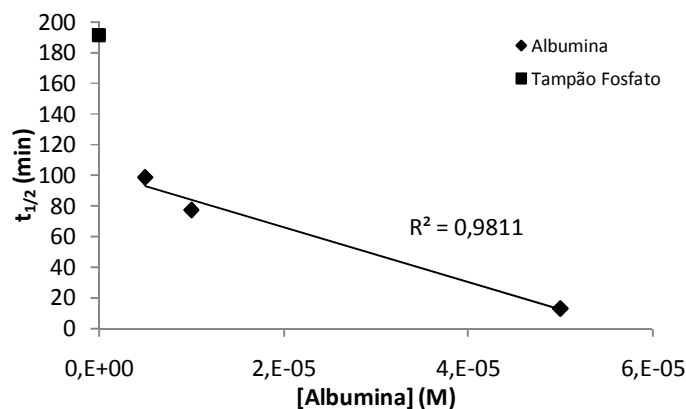


Figura 3.3 – Efeito da albumina humana nos tempos de semi-vida da hidrólise do composto **49b** em tampão fosfato isotónico 7.4, a 37°C.

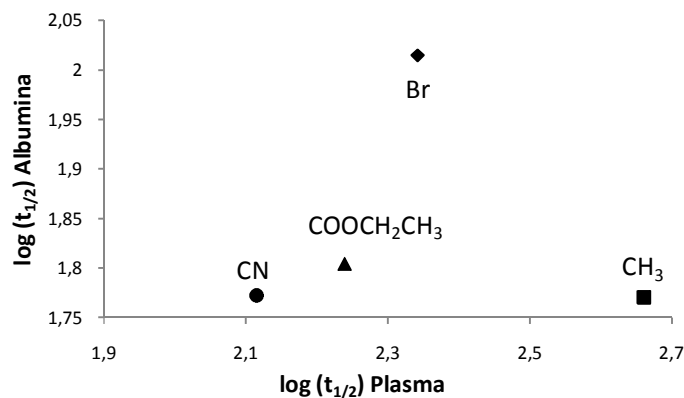


Figura 3.4 – Correlação dos tempos de semi-vida dos compostos **49** em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, e em albumina humana, a 37°C.

Segundo Delben *et al*⁸⁸, que estudaram a influência das albuminas do soro na velocidade de decomposição de vários MMT, a albumina humana provoca uma diminuição mais ou menos acentuada na velocidade de hidrólise. Contudo, não é isto o que acontece com os nossos compostos. Os resultados aqui obtidos, juntamente com os resultados obtidos em plasma humano, indicam-nos que existe efectivamente ligação dos compostos às proteínas plasmáticas e que essa ligação afecta a velocidade de decomposição dos compostos.

Aparentemente, a ligação à albumina protege os compostos da hidrólise espontânea, contudo aumenta as velocidades de hidrólise. Esta ligação deve-se, muito provavelmente, aos dois grupos ácido carboxílico presentes na molécula. De entre a diversidade de fármacos que se ligam fortemente à albumina, existe uma característica comum a todos eles: a presença de grupos carboxílicos⁸⁶.

Apesar da acção exercida pela albumina na velocidade de decomposição dos compostos aqui estudados, está comprovado que esta proteína pode funcionar como transportador de pró-fármacos, nomadamente até locais tumorais. Devido a uma fraca capilaridade vascular conjugada com a ausência ou com a deficiência de um sistema de drenagem linfático eficaz, a albumina pode acumular-se em tecidos malignos e inflamados⁸⁷. Assim, os agentes terapêuticos que tenham afinidade para a albumina podem (hipoteticamente) ser transportados até ao seu local específico de acção em maior quantidade e sem sofrerem hidrólise química espontânea. Assumindo que a interacção com a albumina é rápida e reversível, uma vez no local de acção, os pró-fármacos podem libertar-se e ser activados por uma enzima específica.

3.4 Coeficientes de Partilha Calculados

Para que um determinado composto tenha potencialidade como fármaco, deve existir um equilíbrio entre as suas propriedades de hidrofília e de lipofília. A capacidade de um fármaco se dissolver numa fase lipídica quando uma fase aquosa está também presente é extremamente importante, uma vez que mimetiza o que acontece no organismo. A lipofilicidade é um factor determinante no comportamento de fármacos *in vivo*, nomeadamente: na absorção e na distribuição através das membranas biológicas; no transporte por todo o organismo; na ligação às proteínas do plasma; na acumulação nos tecidos; e no reconhecimento, afinidade e especificidade para um receptor⁸⁹.

O carácter hidrofóbico de um fármaco pode ser medido experimentalmente, testando a sua distribuição relativa numa mistura octanol/água. Este modelo permite simular o transporte dos fármacos até ao seu local de acção. Neste sistema de duas fases (imiscíveis), as moléculas hidrofóbicas vão dissolver-se preferencialmente no *n*-octanol, o solvente lipídico modelo. Por outro lado, as moléculas hidrofílicas vão preferir a fase aquosa. O equilíbrio entre a lipofilicidade e a hidrofílicidade de um composto na sua forma não-ionizada representa-se por um parâmetro chamado coeficiente de partição (*P*), como mostra a equação 3.3.

$$P = \frac{\text{Concentração de fármaco no octanol}}{\text{Concentração de fármaco na fase aquosa}} \quad (3.3)$$

Com base nesta equação⁸⁹:

- Se $P < 1$, o composto é hidrofílico (quanto menor o valor, menor a lipofilicidade);
- Se $P = 1$, o composto tem tanta afinidade para a fase aquosa como para a fase lipídica;
- Se $P > 1$, o composto é hidrofóbico (quanto maior o valor, maior a lipofilicidade).

Por conveniência, a medida de coeficiente de partição faz-se através do seu valor logarítmico ($\log P$). Generalizando, os compostos com $\log P < 0$ são considerados demasiado hidrofílicos para serem bons candidatos a fármacos, particularmente se houver necessidade de atravessar membranas biológicas lipídicas. Os compostos com $\log P > 3,5$ são, normalmente, demasiado lipofílicos para se considerarem bons fármacos, uma vez que são pouco solúveis em água. Regra geral, $\log P \approx 2$ é o valor ao qual corresponde a melhor absorção dos fármacos, na situação em que as moléculas são grandes. Contudo, existem alguns fármacos de sucesso cujos valores de $\log P$ não se enquadram nesta generalização^{6,89}.

O logaritmo do coeficiente de partilha é uma simples aproximação físico-química da complexidade do que ocorre no organismo humano. Contudo, permite-nos fazer previsões *in vitro* acerca do comportamento de uma série de compostos e, assim, seleccionar o mais promissor como fármaco. Posto isto, decidiu-se fazer uma previsão teórica dos valores de $\log P$ dos compostos sintetizados neste trabalho (tabela 3.8). Para isso, recorreu-se ao programa ALOGPS 2.1⁹⁰.

Tabela 3.8 – Valor dos coeficientes de partição (calculados pelo programa ALOGPS 2.1) dos compostos **49**.

Composto (Substituinte em X)	$\log P_{\text{calculado}}$
49a (CN)	0,98 ($\pm 0,58$)
49b (Br)	1,97 ($\pm 0,58$)
49c (CH ₃)	1,59 ($\pm 0,58$)
49d (COCH ₃)	1,12 ($\pm 0,60$)
49e (COOCH ₂ CH ₃)	1,48 ($\pm 0,69$)
49f (CONH ₂)	0,22 ($\pm 0,62$)

Dos resultados de $\log P$ calculados para os derivados **49**, verifica-se que os valores oscilam entre 0,22 e 1,97, evidenciando uma gama de lipofilias, sendo **49b** o mais hidrofóbico e **49f** o menos hidrofóbico. De uma maneira geral, é de esperar que os compostos tenham a capacidade de atravessar membranas biológicas. O composto **49f** é ainda o que apresenta a relação lipofilia/hidrofilia mais próxima. A diferença de $\log P$ entre os vários compostos pode dever-se à influência do substituinte no anel aromático. O coeficiente de partilha é mais elevado para compostos com substituintes alquilo (-CH₃, -CH₂, etc.) ou com halogéneos (-Cl, -

Br, -I), como é o caso dos compostos **49c** e **49b**, respectivamente⁸⁹. Para compostos em que o substituinte é um grupo carbonilo (CO) ou uma amina (NH₂, NHR), o coeficiente de partilha apresenta valores inferiores, o que se verifica para os compostos **49d**, **49e** e **49f**. O log *P* do **49f** é, provavelmente, influenciado pela presença destes dois grupos.

O coeficiente de partilha pode também ser utilizado para avaliação da ligação dos fármacos às proteínas plasmáticas, nomeadamente à albumina. Durante um estudo realizado com o objectivo de verificar qual a relação da hidrofobicidade de 42 fármacos com a sua actividade biológica na presença de albumina, verificou-se que a ligação é determinada pela hidrofobicidade dos compostos. Desse estudo resultou uma relação, de onde se apurou que, quanto maior o log *P*, maior a ligação às albuminas do plasma^{89,91}.

Assumindo que os compostos aqui estudados sofrem uma aceleração na degradação com a presença de albumina humana, era de esperar que o **49b** e o **49c** se ligassem mais a esta proteína e que apresentassem, por isso, os menores tempos de semi-vida. No entanto, isso só aconteceu para o **49c**. Da mesma forma, era de esperar que, entre o **49a** e o **49e**, este último fosse menos estável na presença de albumina humana, mas isto também não acontece. Tendo em conta que parece não existir uma correlação entre a lipofilicidade e a estabilidade em albumina humana, pensa-se que o substituinte aromático dos compostos **49a**, **49b**, **49c** e **49e** tem um papel menor na determinação da interacção com as proteínas plasmáticas e respectiva actividade hidrolítica (figura 3.5). Contudo, há que ter em conta que os valores de log *P* resultam de uma previsão e que o seu cálculo experimental é indispensável à avaliação rigorosa e à obtenção de conclusões exactas.

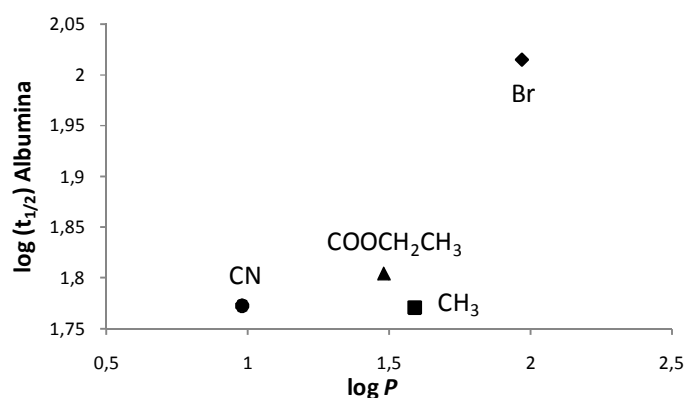


Figura 3.5 – Correlação da lipofilia (estimada) com os tempos de semi-vida em albumina humana, a 37°C, dos compostos **49**.

3.5 Hidrólise dos Derivados Ácido Glutâmico na Presença de Enzima Carboxipeptidase G2

Determinada a estabilidade dos compostos **49** em tampão fosfato pH 7.4, a 37° C, e frente às enzimas plasmáticas, a 37°C, procedeu-se à avaliação destes derivados como substrato da enzima CPG2, ou seja, à avaliação da eficácia de libertação do fármaco (MMT) sob acção da enzima seleccionada para a estratégia ADEPT. Os estudos foram realizados por determinação dos tempos de semi-vida na presença da enzima, recorrendo à espectroscopia de UV. Os métodos de ensaio utilizados neste estudo apresentam algumas modificações relativamente aos encontrados na literatura^{92,93}.

3.5.1 Resultados e Discussão do Estudo Cinético da Hidrólise na Presença de Enzima Carboxipeptidase G2

Inicialmente, traçaram-se espectros dos compostos **49a**, **49b**, **49c** e **49e** em tampão Tris-HCl/ZnCl₂ (0,1M, pH 7.3), a 37°C, de forma a determinar se o comprimento de onda ao qual se pode diferenciar melhor a conversão do substrato nos produtos da reacção diferia muito do determinado em tampão fosfato isotónico. Verificou-se que não existia diferença e, por isso, os c.d.o. utilizados para seguir a reacção de hidrólise na presença de CPG2 foram os descritos na tabela 2.1. Contudo, verificou-se que os compostos eram muito instáveis em Tris-HCl (0,1M), apresentando tempos de semi-vida na ordem dos segundos, pelo que se considerou que nestas condições não era possível realizar os ensaios de cinética enzimática. Na tentativa de solucionar o problema, testou-se a estabilidade dos mesmos em soluções mais diluídas de tampão e verificou-se que a velocidade de hidrólise diminuía (figura 3.6). Todavia, os tempos de semi-vida continuavam ainda demasiado baixos para se poderem realizar os estudos cinéticos na presença da CPG2, isto é, os resultados obtidos iriam depender não só da actividade de hidrólise da enzima, mas também das condições do meio.

Na maioria dos ensaios descritos na literatura, a temperatura utilizada na determinação da eficácia de libertação do fármaco a partir do pró-fármaco pela CPG2 é de 37°C^{37,42,46,92,93}. Contudo, estão referidos outros estudos em que o ensaio cinético frente à CPG2 é feito à temperatura de 30°C^{94,95,96}. Tendo em conta que os compostos **49** são instáveis em Tris-HCl a 37°C, decidiu-se verificar qual o efeito da diminuição da temperatura (para 30°C) na sua estabilidade (gráfico 3.6).

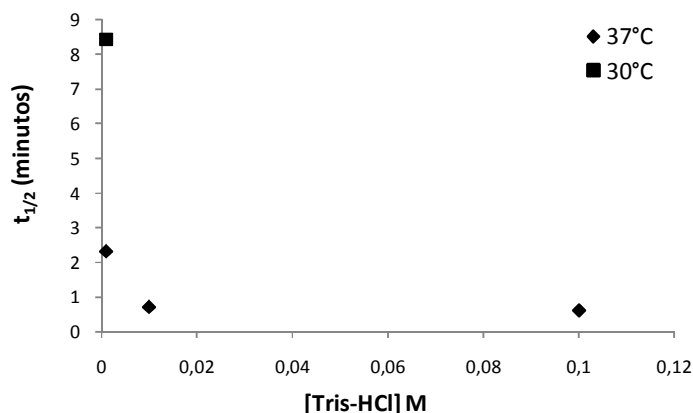


Figura 3.6 – Efeito da concentração do tampão Tris-HCl sobre os tempos de semi-vida do composto **49e**.

Por observação do gráfico anterior, podemos confirmar que a diminuição da temperatura tem como consequência a diminuição da velocidade de hidrólise dos compostos. Consequentemente, os ensaios de estabilidade dos compostos **49a** e **49e** na presença da enzima CPG2 foram realizados em tampão Tris-HCl/ZnCl₂ (0,001M, pH 7.3), a 30°C. Os espectros de UV (bem como as cinéticas de hidrólise química) obtidos para os compostos **49b** e **49c** revelaram diferenças quando comparados com os obtidos em tampão fosfato, sugerindo o aparecimento de produtos da reacção diferentes dos esperados (MMT ou amina). Deste modo, a sua hidrólise na presença de CPG2 não foi estudada.

Para verificar a afinidade de ligação dos compostos à CPG2, determinou-se a constante de velocidade da reacção e o respectivo tempo de semi-vida na presença de concentrações crescentes de enzima. Para isso utilizaram-se as equações 4.1 e 4.2. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 3.9.

Tabela 3.9 – Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de $t_{1/2}$ dos derivados ácido glutâmico (**49**) obtidos por espectroscopia de UV na presença de CPG2 em tampão Tris-HCl (0,001M, pH 7.3), a 30°C.

Composto (Substituinte em X)						
[CPG2] (U/ml)	49a (CN)			49e (COOCH ₂ CH ₃)		
	k _{obs} (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	R ²	k _{obs} (min ⁻¹)	t _{1/2} (min)	R ²
0	0,1351	5,13	0,9522	0,0822	8,43	0,9773
0,005	0,1762	3,96	0,9859	0,0936	7,41	0,9709
0,01	0,2014	3,45	0,9838	0,1223	5,71	0,9741
0,03	0,426	1,66	0,9852	0,2112	3,28	0,9658
0,06	0,7389	0,94	0,9729	0,2728	2,55	0,974

Da observação dos resultados da tabela 3.9, verifica-se que quanto maior a concentração de CPG2, menor o $t_{1/2}$ dos compostos, o que confirma a sua afinidade para esta enzima. É de

referir que, as concentrações de enzima utilizadas nestes ensaios são consideravelmente inferiores às dos procedimentos descritos na maioria da literatura (0,05-50 U/ml), o que nos pode indicar que os compostos **49** são bons substratos da enzima CPG2.

A cinética enzimática é, por vezes, influenciada pelo efeito do substituinte no anel aromático, ou seja, os parâmetros cinéticos da reacção podem ser afectados tanto pelos efeitos estéreos como pelos efeitos electrónicos da estrutura química dos compostos⁹⁷. Apesar de se verificar que os tempos de semi-vida dos compostos **49a** e **49e** não são muito afectados pelo efeito do substituinte ($\sigma_p = 0,66$ e $0,45$, respectivamente), é de referir que pode existir uma correlação destes dois factores. A origem deste efeito (bastante reduzido) não é clara, contudo pensa-se que a velocidade de hidrólise catalisada pela CPG2 possa ser acelerada pela presença de grupos electroattractores.

De seguida, determinaram-se os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ para várias concentrações do potencial pró-fármaco como substrato da CPG2. A concentração de enzima utilizada nos ensaios para os compostos **49a** e **49e** manteve-se constante em cada determinação (0,01 U/ml). Os valores de K_m e $V_{máx}$ foram calculados através de uma regressão não-linear de Michaelis-Menten, por recurso ao programa Graphpad Prism. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 3.10.

Tabela 3.10 – Valores das constantes catalíticas dos derivados ácido glutâmico (**49**) observadas por espectroscopia de UV na presença de CPG2 em tampão Tris-HCl (0,001 M, pH 7.3), a 30°C.

Composto (Substituinte em X)	Parâmetros cinéticos	
49a (CN)	$K_m = 17,7 \pm 0,225 \text{ (}\mu\text{M)}$	$V_{máx} = 4,936 \pm 0,3445 \text{ (}\mu\text{M/min)}$
49e (COOCH ₂ CH ₃)	$K_m = 2,732 \pm 0,7875 \text{ (}\mu\text{M)}$	$V_{máx} = 1,179 \pm 0,12 \text{ (}\mu\text{M/min)}$

Um dos factores com maior influência na velocidade das reacções enzimáticas é a concentração do substrato. A velocidade com que este é libertado do sítio activo depende dos parâmetros cinéticos do sistema enzima/pró-fármaco, nomeadamente do K_m e da $V_{máx}$. O K_m é uma constante catalítica que se expressa como a quantidade de substrato necessária para alcançar metade da velocidade máxima ($V_{máx}$) e que descreve a interacção enzima-substrato. A comparação dos sistemas enzima/pró-fármaco com base exclusivamente na relação destes dois parâmetros é incompleta. Contudo, estabeleceu-se que, quanto menor o K_m , mais eficazes são os sistemas^{97,98}. Deste modo, pela análise da tabela 3.10 verifica-se que o composto que apresenta melhor afinidade para a enzima CPG2 é o **49e**. Ambos os compostos apresentam valores de K_m comparáveis com a gama dos encontrados na literatura (tabela 3.11) para

mostardas de azoto fenólicas e anilinas (**61**), mostardas de azoto *self-immolative* fenólicas e anilinas (**62**) e pró-fármacos fluorados (**63**). Isto indica-nos que a eficiência de hidrólise dos compostos **49** pela CPG2 é suficiente para que estes possam ser estudados como potenciais pró-fármacos para aplicação em estratégias ADEPT^{43,46,93}.

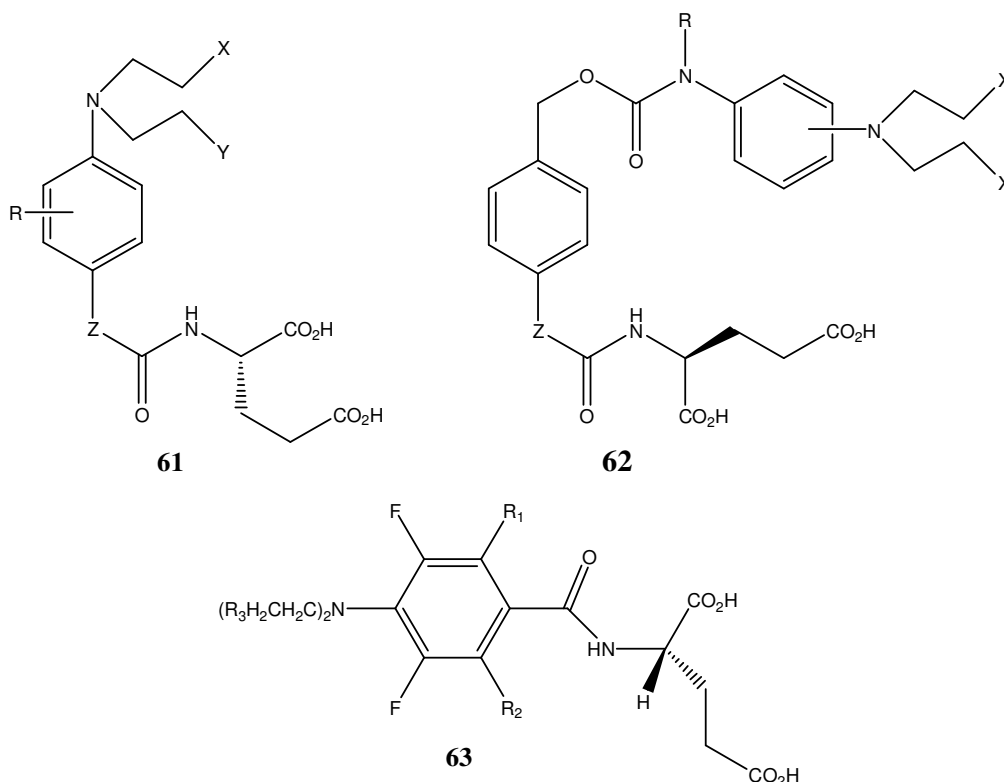


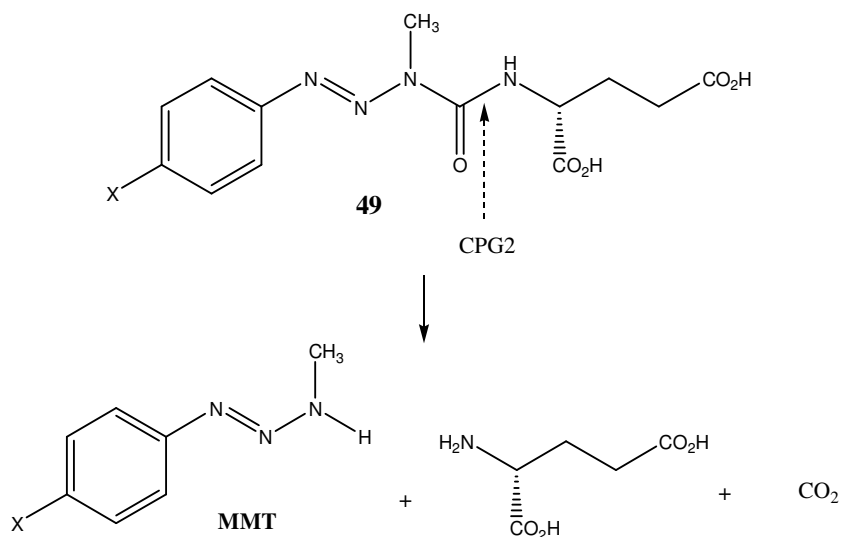
Tabela 3.11 – Valores do parâmetro cinético K_m para os compostos de sucesso encontrados na literatura.

Composto	Substituintes	K_m (μM)
61	R = H, Z = O, X = Y = I	2,0
	R = 3-F, Z = NH, X = Y = Br	5,4
62	R = CH ₃ , Z = O, X = Cl	2,4
	R = CH ₃ , Z = NH, X = Cl	6,1
63	R ₁ = R ₂ = H, R ₃ = I	1,8

A CPG2 é uma exopeptidase dimérica dependente de zinco, capaz de hidrolisar metades C-terminais de glutamato, a partir de ácido fólico e seus análogos. O domínio catalítico da CPG2 tem homologias estruturais com outras exopeptidases dependentes de zinco. Cada subunidade do dímero molecular consiste em dois domínios: o domínio catalítico, maior e contendo dois iões zinco no sítio activo, e o domínio de dimerização, mais pequeno e que constitui a interface do dímero. Dois ligandos de zinco partilhados asseguram uma ponte entre

os iões. São eles um resíduo de ácido aspártico e um ião hidroxilo (molécula de água). O mecanismo de clivagem peptídica proposto para a CPG2 envolve este ião hidroxilo, actuando como um nucleófilo primário do sítio activo da enzima. O resíduo de Glu175 actua como catalisador básico geral, transformando a molécula de água existente na ponte entre os dois iões zinco no nucleófilo atacante: o ião hidroxilo^{36,99}.

Propõe-se o esquema 3.3 para a reacção de clivagem enzimática promovida pela CPG2, que permite a libertação do fármaco (MMT) a partir do pró-fármaco **49**.



Esquema 3.3

3.6 Conclusões

Relativamente aos estudos realizados em tampão fosfato pH 7.4, 0,01M, a 37°C, os compostos revelaram uma gama de estabilidades variadas, com tempos de semi-vida que vão de 2 minutos a 7 horas. Com base nos resultados obtidos, a escolha dos compostos **49** como potenciais candidatos a pró-fármacos para aplicação na estratégia ADEPT deve ser cautelosa. Uma vez que a hidrólise química destes compostos ocorre com relativa rapidez, a concentração de pró-fármaco que chega ao local do tumor pode estar em causa, ou seja, pode não ser suficiente para que haja, posteriormente, efeito terapêutico. Para além disso, nos casos em que o pró-fármaco se decompõe instantaneamente no MMT (fármaco activo), a presença deste agente alquilante em circulação, deverá desencadear efeitos secundários adversos. Mas mais importante de analisar será provavelmente a razão entre os $t_{1/2}$ dos pró-fármacos e os dos respectivos fármacos (MMT). Idealmente os pró-fármacos deverão possuir $t_{1/2}$ superiores aos apresentados pelos seus fármacos. Só assim se evitará a hidrólise prematura dos pró-fármacos em circulação e os efeitos “*leak back*” (fuga) dos fármacos a partir dos tumores, com o consequente aparecimento dos efeitos citotóxicos inespecíficos. Contudo, é de referir que não havendo um valor referência para tempos de semi-vida ideais, podemos estabelecer uma comparação com a temozolomida, um triazeno introduzido recentemente em clínica, cujo tempo de semi-vida é de aproximadamente duas horas em tampão fosfato isotónico. Assim, conclui-se que a potencial aplicação dos compostos sintetizados neste trabalho como pró-fármacos obriga a alguma ponderação.

Quanto aos compostos mais reactivos (**49d** e **49f**), concluiu-se à partida que são provavelmente demasiado instáveis em condições fisiológicas para se desenvolverem como pró-fármacos e que, perante a sua reduzida estabilidade em solução, podem mesmo surgir problemas de formulação. No entanto, é de mencionar que um dos mais recentes pró-fármacos candidato à realização de ensaios clínicos, o ZD2767, apresenta tempos de semi-vida na ordem dos segundos.

Quanto aos resultados obtidos em plasma humano e na presença de albumina humana, conclui-se que a decomposição dos compostos **49** é acelerada pelas proteínas do plasma, libertando por hidrólise os correspondentes agentes alquilantes: os MMT. Isto pode tornar-se desvantajoso no seu desenvolvimento como pró-fármacos para aplicação numa estratégia ADEPT, tendo em conta que podem sofrer degradação antes de alcançar o local específico de acção, ou seja, as células tumorais. Por outro lado, a hipótese da ligação às proteínas

plasmáticas como meio de protecção à hidrólise prematura destes pró-fármacos até alcançarem o seu local de acção não é de desprezar como processo de viabilização. Tendo em conta estes factos, é de considerar a possibilidade de ligação dos compostos a outro tipo de proteínas, como é o caso dos anti-corpos. A realização de estudos *in vivo* (em ratos) que permitissem definir um perfil de concentração *versus* tempo relativamente à distribuição dos pró-fármacos e dos fármacos activos no plasma (na presença e na ausência do CEA), seria essencial para nos elucidar quanto à ligação dos compostos às proteínas plasmáticas e quanto à acção das mesmas sobre a sua velocidade de hidrólise.

Dos resultados referentes aos ensaios enzimáticos na presença de CPG2, pode concluir-se que os compostos sintetizados são bons substratos desta enzima, libertando os agentes de degradação MMT ou amina na sua presença. Deste ponto de vista, os pró-fármacos sintetizados são bons candidatos para aplicação em estratégias ADEPT que façam uso da CPG2 como enzima de activação. Só a combinação óptima dos parâmetros físico-químicos com os parâmetros biológicos poderá definir qual o candidato de melhor escolha para aplicação na estratégia ADEPT. Contudo, seria crucial realizar estudos de HPLC preparativa ou de espectroscopia de massa por cromatografia líquida, de forma a confirmar e identificar os metabolitos activos libertados da hidrólise pela CPG2. A realização de estudos posteriores, nomeadamente em linhas celulares cancerígenas construídas para expressarem a enzima CPG2, seria também imprescindível para avaliação da citotoxicidade dos compostos e para confirmação da sua aplicação no tratamento do cancro. Por último, deveria proceder-se à realização de estudos *in vivo* de forma a avaliar o efeito dos compostos (sobre o volume do tumor, por exemplo) e, consequentemente, a sua eficácia terapêutica.

Concluindo, o maior problema no desenvolvimento dos compostos **49** como pró-fármacos reside na sua capacidade de ligação às proteínas plasmáticas e consequente reacção de hidrólise.

Capítulo 4

Procedimiento Experimental

4.1 Equipamento

Os Pontos de Fusão (p.f.) foram determinados numa câmara de Köfler Bock-Monoscop “M”.

Os espectros de Infra-Vermelho (IV) foram obtidos com um espectrofotómetro NICOLET Modelo Impact 400 FTIR, usando pastilha de brometo de potássio (KBr) ou de cloreto de sódio (NaCl).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Protão (^1H -RMN) e de Carbono (^{13}C -RMN) foram traçados num espectrofotómetro Bruker 400 Ultra-Shield. Os valores de desvio químico, δ_{H} ou δ_{C} , estão cotados em partes por milhão (ppm) relativamente ao Tetrametilsilano (TMS) e as constantes de acoplamento, J , estão cotadas em Hertz (Hz).

Os espectros de massa foram obtidos na Unidade de Massas e Proteómica da Universidade de Santiago de Compostela com um espectrofotómetro de massa quadrupolar da Hewlett-Packard, modelo HP5988A, utilizando o impacto electrónico (positivo e negativo) de baixa resolução. O programa de obtenção da análise foi o AutoSpec.

Para se determinar o melhor comprimento de onda (c.d.o.) a utilizar nos estudos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizou-se o espectrofotómetro UV-Visível Shimadzu UV-2100 acoplado a um sistema de aquecimento termostatado da Shimadzu CPS-260.

O estudo da hidrólise dos pró-fármacos de triazenos por HPLC foi realizado num sistema VWR constituído por uma bomba VWR-Hitachi L-2130 ELITE LaChrom com um injector de 20 μL Rheodyne, um detector UV VWR-Hitachi L-2400 ELITE LaChrom e uma coluna Lichrospher® 100 RP-18 (5 μm). Para tratamento dos cromatogramas utilizou-se o programa EZChrom Elite Chromatography Data System da VWR que corria sobre o sistema operativo Windows XP Professional.

Nos estudos de hidrólise em plasma humano e em albumina humana usou-se uma centrífuga SIGMA 112 (13000 rpm) e um vortex Genie™, Modelo K-550-GE, Scientific Industries, Inc. Para termostatar estas soluções reaccionais, bem como as do ensaio de hidrólise em tampão fosfato, utilizou-se um banho Julabo MP com refrigerante Julabo F12 incorporado.

Nos ensaios cinéticos de hidrólise enzimática por Ultra-Visível (UV) utilizou-se um espectrofotómetro UV-Visível Shimadzu UV-1700 acoplado a um sistema de aquecimento termostatado da Shimadzu CPS-240, de maneira a manter constante a temperatura nas células, com uma precisão de $\pm 1^\circ\text{C}$.

O pH das soluções foi medido num potenciómetro Crison micro pH 2002.

4.2 Cromatografia

Na cromatografia em camada delgada (c.c.d.) usaram-se placas de sílica da Merck DC kieselgel 60 F₂₅₄. As placas cromatográficas c.c.d. foram reveladas usando uma câmara de UV CAMAG, com um c.d.o. de 254nm.

Na cromatografia em coluna utilizou-se sílica gel da Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm).

4.3 Solventes

Na síntese dos vários compostos usaram-se solvente puros ou de grau analítico (*p.a.*).

O tetrahidrofurano (THF) da Panreac foi refluxado, antes de cada utilização, na presença de fio de sódio, usando como indicador de humidade a benzofenona (Merck).

O diclorometano (CH₂Cl₂) e o nitrometano (Merck) foram destilados de cloreto de cálcio anidro e guardados em frasco escuro, no frigorífico.

Os solventes utilizados na separação cromatográfica, purificação dos produtos sintetizados e nos estudos cinéticos por UV eram de grau analítico. Nos estudos de estabilidade por HPLC, utilizaram-se solventes LiChrosolve® da Merck.

Os solventes deuterados usados para RMN foram clorofórmio (CDCl₃), metanol (CD₃OD) ou dimetilsulfóxido (d₆-DMSO) da Merck.

Na preparação de soluções aquosas usou-se água desionizada obtida através da passagem de água bidestilada numa resina de troca iónica Millipore, sendo recolhida com uma resistividade de 18 MΩcm.

4.4 Reagentes

Os reagentes utilizados na síntese dos vários compostos, o cloroformato de 4-nitrofenilo, o cloroformato de 2,2,2-tricloroetilo, as aminas sólidas e o 1-(4-metilfenil)-3-metiltriazeno não sofreram qualquer purificação adicional (Fluka, Merck e Sigma-Aldrich).

A piridina (Merck) e a trietilamina (Sigma – Aldrich) foram destiladas de hidróxido de potássio em lentilhas e guardadas em frascos escuros, no frigorífico.

O tampão fosfato (pH 7.4, 0.01 M, a 25°C) foi preparado dissolvendo-se uma pastilha do PBS (Sigma-Aldrich) em 200ml de água desionizada.

Os sais inorgânicos utilizados na preparação de tampões eram de grau puro e de grau analítico (Merck).

4.5 Enzimas e Substratos

A carboxipeptidase G2 bacteriana *pseudomonas sp* (purificada por cromatografia) foi adquirida à Sigma-Aldrich e armazenada em alíquotas de 50 µl (1 U/ml) a -20°C. O respectivo substrato (éster di-*terc*-butilico do ácido glutâmico) foi fornecido pela Fluka e armazenado no frigorífico. A albumina humana (fracção V, 96-99% albumina) foi adquirida à Sigma-Aldrich e armazenada na arca congeladora a -20°C.

4.6 Triazenos

Nota de atenção: Os compostos aqui sintetizados, bem como os intermédios reaccionais, são agentes potencialmente alquilantes. Devem ser encarados como tóxicos e nocivos para o homem e, por isso, sintetizados e manipulados com cuidado e segurança.

4.6.1 Síntese dos Hidroximetiltriazenos e dos Monometiltriazenos

Os hidroximetiltriazenos (HMT) foram sintetizados de acordo com o procedimento desenvolvido por L. Fernandes¹⁰⁰. A técnica envolve, numa primeira fase, a diazotação de anilinas, com agitação mecânica à temperatura de -10°C. Dissolveu-se a anilina (0,023 mol) em HCl (6 ml) e água destilada (100 ml) e adicionou-se nitrito de sódio (1,7 g, 0,025 mol). Após 1h, procedeu-se à neutralização da solução com NaOH 1M até pH 6. De seguida, adicionou-se uma solução aquosa de formaldeído (75 ml) e, posteriormente, juntou-se, gota a gota, uma solução a 40% de metilamina (7,5 ml, 0,1 mol). Os HMT foram isolados por filtração e, posteriormente, caracterizados por IV e p.f.

Os monometiltriazenos (MMT) sintetizaram-se pela técnica de Cheng e Iley¹⁰¹ na qual se procedeu à decomposição dos precursores HMT por catálise pela metilamina (3 x nº moles de anilina). Os MMT obtidos desta forma não necessitaram de res cristalização e foram identificados por p.f. e por IV.

4.6.2 Síntese dos Derivados 4-nitrofenilo

Método A – Reacção com o Cloroformato de 4-nitrofenilo

Para obtenção dos derivados 4-nitrofenilo, adicionou-se o cloroformato de 4-nitrofenilo (1,58 mmol) a uma solução de MMT (1,31 mmol) em CH₂Cl₂ (5 ml). Colocou-se a mistura reaccional em agitação à temperatura ambiente, observando-se a formação de espuma e o aparecimento de uma cõr amarelada. De seguida, adicionou-se piridina (1,3 1mmol) à mistura

reaccional e verificou-se a formação de um precipitado. A reacção manteve-se em agitação, sendo seguida por c.c.d. Ao fim de 24h evaporou-se o solvente a pressão reduzida e a mistura resultante foi separada por cromatografia em coluna e/ou por placa preparativa. Os compostos assim isolados foram recristalizados e caracterizados por técnicas de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e espectroscopia de massa. Os eluentes usados na cromatografia, os solventes usados na recristalização, os valores de p.f. e os rendimentos obtidos estão descritos na tabela 4.1. Foram sintetizados por este método os compostos **50a-f**.

Método B – Reacção com o Cloroformato de 2,2,2-tricloroetilo

Ao MMT (4,83 mmol) dissolvido em piridina destilada (10 ml) adicionou-se o cloroformato de 2,2,2-tricloroetilo (5,8 mmol), verificando-se a libertação de fumo. Deixou-se a reacção em agitação à temperatura ambiente durante 24h e, de seguida, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e a mistura resultante foi separada por coluna de cromatografia. O composto isolado foi recristalizado e caracterizado por técnicas de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e espectroscopia de massa. Os eluentes usados na cromatografia, os solventes usados na recristalização, os valores de p.f. e os rendimentos obtidos estão descritos na tabela 4.1. Foi sintetizado por este método o composto **50f**.

Tabela 4.1 – Solventes de eluição e de recristalização, pontos de fusão e rendimentos de reacção para os compostos **50**.

50	Solvente Eluição	Solvente Recristalização	p.f. (°C)	Rendimento (%)
a	CH_2Cl_2	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$	186	45
b	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$ (7:3)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$	176-178	55
c	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$ (7:3)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$	166-168	46
d	CH_2Cl_2	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$	178-180	21
e	CH_2Cl_2	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$	175	42
f	Método A*			
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (9,5:0,5)	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$	189-192	8
	Método B			
	$\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ (1:1)	$\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2/n\text{-Hex}$	195-197	4

* Separação feita por placa preparativa

4.6.2.1 Caracterização Estrutural dos Derivados 1-aril-3-[(4-nitrofenil)oxicarbonil]-3-metiltriazenos

3-[4-nitrofeniloxicarbonil]-1-(4-cianofenil)-3-metiltriazeno (**50a**)

IV $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2224 (CN); 1741 (CONH); 1523 e 1350,51 (NO_2)

¹H-RMN δ_H /ppm (CDCl₃, 400MHz): 3,62 (3H, s, NCH₃); 7,75-7,78 (4H, AA'BB', $J=9,2$ Hz, ArMMT); 7,45-8,33 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz, ArNO₂)

¹³C-RMN δ_C /ppm (CDCl₃, 100MHz): 31,03 (NCH₃); 112,74 (ArMMT); 118,43 (CN); 122,46 (ArMMT); 123,11 (ArNO₂); 125,42 (ArMMT); 133,35 (ArNO₂); 145,67 (ArNO₂); 151,16 (ArMMT); 155,39 (ArNO₂)

MS-EI m/z (%): 325 (10, M⁺); 130 (83, [CNArN₂]⁺); 102 (100, [CNArN₂]⁺)

3-[4-nitrofeniloxicarbonil]-1-(4-bromofenil)-3-metiltriazeno (50b)

IV $\nu_{\text{máx}}$ /cm⁻¹: 1737 (CONH); 1523 e 1351 (NO₂)

¹H-RMN δ_H /ppm (CDCl₃, 400MHz): 3,58 (3H, s, NCH₃); 7,56-7,60 (4H, AA'BB', $J=9,2$ Hz, ArMMT); 7,45-8,33 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz, ArNO₂)

¹³C-RMN δ_C /ppm (CDCl₃, 100MHz): 30,65 (NCH₃); 122,50 (ArMMT); 123,98 (ArNO₂); 125,36 (ArMMT); 132,42 (ArMMT); 145,56 (ArNO₂); 147,20 (ArMMT)

MS-EI m/z (%): 380 (8, M⁺ + 2); 378 (8, M⁺); 185 (63, [BrArN₂]⁺ + 2); 183 (65, [BrArN₂]⁺); 157 (98 [BrAr]⁺ + 2); 155 (100, [BrAr]⁺)

3-[4-nitrofeniloxicarbonil]-1-(4-toluil)-3-metiltriazeno (50c)

IV $\nu_{\text{máx}}$ /cm⁻¹: 1732 (CONH); 1519 e 1351 (NO₂)

¹H-RMN δ_H /ppm (CDCl₃, 400MHz): 2,39 (3H, s, CH₃Ar); 3,57 (3H, s, NCH₃); 7,25-7,59 (4H, AA'XX', $J=8,4$ Hz, ArMMT); 7,45-8,32 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz, ArNO₂)

¹³C-RMN δ_C /ppm (CDCl₃, 100MHz): 21,37 (CH₃Ar); 30,40 (NCH₃); 122,33 (ArMMT); 122,54 (ArNO₂); 125,31 (ArMMT); 129,85 (ArMMT); 139, 99 (ArMMT); 145,44 (ArNO₂); 146,10 (ArMMT)

MS-EI m/z (%): 314 (14, M⁺); 119 (91, [CH₃ArN₂]⁺); 91 (100, [CH₃Ar]⁺)

3-[4-nitrofeniloxicarbonil]-1-(4-acetilfenil)-3-metiltriazeno (50d)

IV $\nu_{\text{máx}}$ /cm⁻¹: 1739 (CONH); 1686 (COCH₃); 1524 e 1347 (NO₂)

¹H-RMN δ_H /ppm (CDCl₃, 400MHz): 2,64 (3H, s, COCH₃); 3,61 (3H, s, NCH₃); 7,75-8,05 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz, ArMMT); 7,46-8,33 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz, ArNO₂)

¹³C-RMN δ_C /ppm (CDCl₃, 100MHz): 26,80 (COCH₃); 30,85 (NCH₃); 122,49 (ArMMT); 122,55 (ArNO₂); 125,39 (ArMMT); 129,55 (ArMMT); 137,40 (ArNO₂); 147, 84 (ArNO₂); 152,57 (NCH₃CO); 197,31 (COCH₃)

MS-EI m/z (%): 342 (2, M⁺); 147; (48, [CH₃COArN₂]⁺); 122 (3, [NO₂Ar]⁺); 119 (100, [CH₃COAr]⁺)

3-[4-nitrofeniloxicarbonil]-1-(4-etoxicarbonilfenil)-3-metiltriazeno (50e)

IV $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1745 (CONH); 1719 (OCOCH₂CH₃); 1526 e 1350 (NO₂)

¹H-RMN $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 400MHz): 1,41 (3H, t, $J=7,2$ Hz, CH₂CH₃); 3,61 (3H, s, NCH₃); 4,38 (2H, q, $J=7,2$ Hz, COOCH₂CH₃); 7,73-8,14 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz, ArMMT); 7,47-8,34 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz, ArNO₂)

¹³C-RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 100MHz): 14,34 (COOCH₂CH₃); 30,79 (NCH₃); 61,28 (COOCH₂CH₃); 122,28 (ArMMT); 125,37 (ArNO₂); 130,72 (ArMMT); 145,60 (ArNO₂); 151,39 (ArNO₂); 152,03 (ArMMT); 155,54 (NCH₃CO); 165,99 (COOCH₂CH₃)

MS-EI m/z (%): 372 (5, M⁺); 327 (8, [COOArN₂NCH₃CO₂ArNO₂]⁺); 299 (1, [ArN₂NCH₃CO₂ArNO₂]⁺); 177 (55, [CH₃CH₂COOArN₂]⁺); 149 (100, [CH₃CH₂COOAr]⁺)

3-[4-nitrofeniloxicarbonil]-1-(4-aminocarbonilfenil)-3-metiltriazeno (50f)

IV $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3387 (NH₂CO); 1739 (CONH); 1702 (CONH₂); 1522 e 1348 (NO₂)

¹H-RMN $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 400MHz): 3,61 (3H, s, NCH₃); 5,65 (1H, s alargado, NH); 6,01 (1H, s alargado, CONH₂); 7,75-7,91 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz, ArMMT); 7,46-8,34 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz, ArNO₂)

MS-EI m/z (%): 148 (73, [NH₂COArN₂]⁺); 120 (100, [NH₂COAr]⁺)

4.6.3 Síntese dos Derivados com o Grupo Boc

Na síntese dos pró-fármacos com o grupo protector Boc, adicionou-se trietilamina (13 mmol) ao éster di-*terc*-butílico do ácido glutâmico (8,63 mmol) dissolvido em THF seco (5 ml) e colocou-se a mistura reaccional em agitação à temperatura ambiente. Seguidamente, juntou-se o derivado 4-nitrofenilo (4,25 mmol) à mistura e seguiu-se a reacção por c.c.d. Após 48h parou-se a reacção, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e o resíduo seco resultante foi separado em coluna de cromatografia. Os derivados com o grupo Boc obtidos foram recristalizados e caracterizados por técnicas de IV, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, Cosy-RMN e espectroscopia de massa. Os eluentes usados na cromatografia, os solventes usados na recristalização, os valores de p.f. e os rendimentos obtidos estão descritos na tabela 4.2. Foram sintetizados por este método os compostos **52a-f**.

Tabela 4.2 – Solventes de eluição e de recristalização, pontos de fusão e rendimentos de reacção para os compostos **52**.

52	Solvente Eluição	Solvente Recristalização	p.f. (°C)	Rendimento (%)
a	Éter Etílico/Éter Petróleo (1:1)	Éter Etílico/ <i>n</i> -Hex	65	77
b	AcOEt/ <i>n</i> -Hex (7:3)	AcOEt/ <i>n</i> -Hex	84-85	97
c	CH ₂ Cl ₂	-	48-50	88
d	AcOEt/ <i>n</i> -Hex (7:3)	-	Óleo	92
e	AcOEt/ <i>n</i> -Hex (7:3)	-	Óleo	80
f	AcOEt	-	47-49	100

4.6.3.1 Caracterização Estrutural dos Derivados [1-(4-fenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-di-*terc*-butil-L-glutamato

[1-(4-cianofenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-di-*terc*-butil-L-glutamato (**52a**)

$\text{IV } \nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 2225 (CN); 1731 (CONH); 1705 (CO₂tBu); 1155 (CO₂tBu)

$^1\text{H-RMN } \delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 400MHz): 1,36 (9H, s, (CH₃)₃); 1,52 (9H, s, (CH₃)₃); 2,09 (1H, m, *J*=7,2 Hz, CHCH₂CH₂); 2,23 (1H, m, *J*=4,4 Hz, CHCH₂CH₂); 2,41 (2H, m, *J*=7,2 Hz, CHCH₂CH₂); 3,349 (3H, s, NCH₃); 4,53 (1H, m, *J*=4,4 Hz, CHCH₂CH₂); 7,44 (1H, d, *J*=7,6 Hz, CONH); 7,74-7,77 (4H, AA'BB', *J*=9,2 Hz, ArMMT)

$\text{MS-EI } m/z$ (%): 445 (1, M⁺); 129,9 (76, [CNArN₂]⁺); 102 (60, [CNAr]⁺); 57 (100, [(CH₃)₃]⁺)

[1-(4-bromofenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-di-*terc*-butil-L-glutamato (**52b**)

$\text{IV } \nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1733 (CONH); 1689 (CO₂tBu); 1153 (CO₂tBu)

$^1\text{H-RMN } \delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 400MHz): 1,42 (9H, s, (CH₃)₃); 1,52 (9H, s, (CH₃)₃); 2,07 (1H, m, *J*=7,6 Hz, CHCH₂CH₂); 2,23 (1H, m, *J*=4,4 Hz, CHCH₂CH₂); 2,40 (2H, m, *J*=7,6 Hz, CHCH₂CH₂); 3,46 (3H, s, NCH₃); 4,55 (1H, m, *J*=4,4 Hz, CHCH₂CH₂); 7,53-7,58 (4H, AA'BB', *J*=9,2 Hz, ArMMT)

$^{13}\text{C-RMN } \delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 100MHz): 27,55 (CHCH₂CH₂); 28,04 ((CH₃)₃); 28,57 (CHCH₂CH₂); 31,66 (NCH₃); 53,77 (CHCH₂CH₂); 82,39 (C(CH₃)₃); 122,22 (ArMMT); 123,54 (ArMMT); 132,25 (ArMMT); 147,90 (ArMMT); 155,43 (CONH); 171,18 (CO₂tBu); 172, 53 (CO₂tBu)

$\text{MS-EI } m/z$ (%): 500 (1, M⁺); 185 (42, [BrArN₂]⁺ + 2); 183 (34, [BrArN₂]⁺); 157 (26, [BrAr]⁺ + 2); 155 (26, [BrAr]⁺); 57 (100, [(CH₃)₃]⁺)

[1-(4-toluil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-di-*terc*-butil-L-glutamato (**52c**)

$\text{IV } \nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 1729 (CONH); 1701 (CO₂tBu); 1153 (CO₂tBu)

$^1\text{H-RMN } \delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 400MHz): 1,43 (9H, s, (CH₃)₃); 1,52 (9H, s, (CH₃)₃); 2,41 (3H, s, CH₃Ar); 2,06 (1H, m, *J*=8 Hz, CHCH₂CH₂); 2,24 (1H, m, *J*=4,8 Hz, CHCH₂CH₂); 2,39 (2H, m, *J*=8 Hz,

CHCH₂CH₂); 3,45 (3H, s, NCH₃); 4,57 (1H, m, *J*=4,8 Hz, CHCH₂CH₂); 7,21 (1H, d, *J*=8 Hz, CONH); 7,25-7,54 (4H, AA'XX', *J*=8,4 Hz, ArMMT)

¹³C-RMN δ_C/ppm (CDCl₃, 100MHz): 21,28 (CH₃Ar); 27,89 (CHCH₂CH₂); 28,05 ((CH₃)₃); 28,30 (CHCH₂CH₂); 31,65 (NCH₃); 53,59 (CHCH₂CH₂); 82,31 (C(CH₃)₃); 121,80 (ArMMT); 129,74 (ArMMT); 138,67 (ArMMT); 146,76 (ArMMT); 154,72 (CONH); 171,26 (CO₂tBu); 172,79 (CO₂tBu)

MS-EI *m/z* (%): 434 (3, M⁺); 119 (50, [CH₃ArN₂]⁺); 91 (82, [CH₃Ar]⁺); 57 (100, [(CH₃)₃]⁺)

[1-(4-acetilfenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-di-terc-butil-L-glutamato (52d)

IV ν_{máx}/cm⁻¹: 1724 (CONH); 1686 (CO₂tBu); 1153 (CO₂tBu)

¹H-RMN δ_H/ppm (CDCl₃, 400MHz): 1,42 (9H, s, (CH₃)₃); 1,52 (9H, s, (CH₃)₃); 2,66 (3H, s, COCH₃); 2,08 (1H, m, *J*=7,6 Hz, CHCH₂CH₂); 2,25 (1H, m, *J*=4,4 Hz, CHCH₂CH₂); 2,40 (2H, m, *J*=7,6 Hz, CHCH₂CH₂); 3,50 (3H, s, NCH₃); 4,55 (1H, m, *J*=4,4 Hz, CHCH₂CH₂); 7,37 (1H, d, *J*=7,6 Hz, CONH); 7,72-8,06 (4H, AA'XX', *J*=8,8 Hz, ArMMT)

¹³C-RMN δ_C/ppm (CDCl₃, 100MHz): 26,75 (CHCH₂CH₂); 27,53 (CHCH₂CH₂); 28,04 ((CH₃)₃); 28,77 (COCH₃); 31,64 (NCH₃); 53,81 (CHCH₂CH₂); 82,48 (C(CH₃)₃); 122,06 (ArMMT); 129,55 (ArMMT); 136,49 (ArMMT); 152,29 (CONH); 154,26 (ArMMT); 171,10 (CO₂tBu); 172,51 (CO₂tBu); 197,38 (CH₃CO)

MS-EI *m/z* (%): 462 (2, M⁺); 147 (90, [CH₃COArN₂]⁺); 119 (90, [CH₃COAr]⁺); 57 (100, [(CH₃)₃]⁺)

[1-(4-etoxicarbonilfenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-di-terc-butil-L-glutamato (52e)

IV ν_{máx}/cm⁻¹: 1723 (CONH); 1154 (CO₂tBu)

¹H-RMN δ_H/ppm (CDCl₃, 400MHz): 1,405 (3H, t, *J*=7,2 Hz, COOCH₂CH₃); 1,45 (9H, s, (CH₃)₃); 1,47 (9H, s, (CH₃)₃); 2,05 (1H, m, *J*=8 Hz, CHCH₂CH₂); 2,22 (1H, m, *J*=4,4 Hz, CHCH₂CH₂); 2,38 (2H, m, *J*=8 Hz, CHCH₂CH₂); 3,46 (3H, s, NCH₃); 4,39 (2H, q, *J*=7,2 Hz, COOCH₂CH₃); 4,53 (1H, m, *J*=4,4 Hz, CHCH₂CH₂); 7,34 (1H, d, *J*=8 Hz, CONH); 7,68-8,12 (4H, AA'XX', *J*=8,8 Hz, ArMMT)

¹³C-RMN δ_C/ppm (CDCl₃, 100MHz): 14,33 (COOCH₂CH₃); 27,51 (CHCH₂CH₂); 28,09 ((CH₃)₃); 28,70 (CHCH₂CH₂); 31,88 (NCH₃); 53,79 (CHCH₂CH₂); 80,86 (C(CH₃)₃); 121,80 (ArMMT); 152,16 (ArMMT); 154,29 (NCH₃CO); 166,16 (CO₂tBu); 171,07 (COOCH₂CH₃); 172,49 (CO₂tBu)

MS-EI *m/z* (%): 492 (1, M⁺); 177 (26, [CH₃CH₂COOArN₂]⁺); 149 (45, [CH₃CH₂COOAr]⁺); 57 (100, [(CH₃)₃]⁺)

[1-(4-aminocarbonilfenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-di-terc-butil-L-glutamato (52f)

IV ν_{máx}/cm⁻¹: 3365 (NH₂); 1726 (CONH); 1679 (CO₂tBu); 1154 (CO₂tBu)

^1H -RMN δ_{H} /ppm (CDCl_3 , 400MHz): 1,42 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3$); 1,51 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3$); 2,07 (1H, m, $J=7,6$ Hz, CHCH_2CH_2); 2,24 (1H, m, $J=4,8$ Hz, CHCH_2CH_2); 3,38 (3H, s, NCH_3); 2,38 (2H, m, $J=7,6$ Hz, CHCH_2CH_2); 4,55 (1H, m, $J=4,8$ Hz, CHCH_2CH_2); 6,21 (1H, s alargado, CONH_2); 7,34 (1H, d, $J=8$ Hz, CONH); 7,71-7,91 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz, ArMMT)

^{13}C -RMN δ_{C} /ppm (CDCl_3 , 100MHz): 27,54 (CHCH_2CH_2); 28,06 ($(\text{CH}_3)_3$); 28,72 (CHCH_2CH_2); 31,94 (NCH_3); 54,34 (CHCH_2CH_2); 82,47 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 122,11 (ArMMT); 128,50 (ArMMT); 132,75 (ArMMT); 151,61 (CONH); 154,30 (ArMMT); 168,64 (CONH_2); 171,13 (CO_2tBu); 172,50 (CO_2tBu)

MS-EI m/z (%): 148 (66, $[\text{NH}_2\text{COArN}_2]^+$); 120 (100, $[\text{NH}_2\text{COAr}]^+$); 57 (20, $[(\text{CH}_3)_3]^+$)

4.6.4 Síntese dos Derivados Ácido Glutâmico

Método A – Reacção com o TFA à Temperatura Ambiente

Dissolveu-se o pró-fármaco com o grupo Boc (3,5 mmol) em CH_2Cl_2 (2 ml) e adicionou-se ácido trifluoroacético puro (0,13 mol), verificando-se uma mudança automática de cor, para castanho. Deixou-se a reacção em agitação à temperatura ambiente durante 3 horas. Evaporou-se o TFA e obteve-se um óleo que não foi possível purificar. Os produtos obtidos foram caracterizados por técnicas de IV e de ^1H -RMN. Deste processo não resultou a nenhum produto pretendido.

Método B – Reacção com o TFA a Frio

Na reacção de desprotecção dos pró-fármacos com o grupo protector Boc, adicionou-se anisol (3,04 mmol) ao TFA (0,23 mol)^{72,73} e colocou-se a mistura com agitação em gelo durante 10min. Posteriormente, adicionou-se o derivado com o grupo Boc (2,1 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 seco (1 ml) e seguiu-se a reacção por c.c.d. Após 5h, evaporou-se o solvente a pressão reduzida e secou-se o produto totalmente na bomba de vácuo. Os balões com os produtos resultantes (óleo) foram guardados no congelador e não foi possível recrystalizá-los. Os produtos obtidos foram caracterizados por técnicas de IV, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, Cosy-RMN e espectroscopia de massa. Foram sintetizados por este método os compostos **49a-f**.

Método C – Reacção com o Ácido Clorídrico Gasoso a Frio

Dissolveu-se o pró-fármaco com o grupo Boc (0,8 mmol) em nitrometano seco (5 ml) e arrefeceu-se a solução num banho de gelo. Nesta mistura fez-se borbulhar H_2SO_4 anidro durante 10 a 15 minutos e seguiu-se a reacção por c.c.d.¹⁰² Uma vez terminada, evaporou-se o solvente a resíduo seco na bomba de vácuo. Os produtos obtidos apresentaram-se sobre a

forma de óleo e não foi possível recristalizá-los. A sua caracterização foi feita por técnicas de IV e de ^1H -RMN. Deste processo não resultou nenhum dos produtos pretendidos.

4.6.4.1 Caracterização Estrutural dos Derivados Ácido [1-(4-fenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-L-glutâmico

Ácido [1-(4-cianofenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-L-glutâmico (49a)

IV $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3522 (OH); 2231 (CN); 1769 (CONH); 1707 (CO₂H)

^1H -RMN $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 400MHz): 2,05 (1H, m, CHCH₂CH₂); 2,38 (1H, m, CHCH₂CH₂); 2,48 (2H, m, CHCH₂CH₂); 3,02 (3H, s, NCH₃); 4,15 (1H, q, $J=3,6$ Hz, CHCH₂CH₂); 8,15-8,89 (4H, AA'XX', $J=9,2$ Hz, ArMMT)

^{13}C -RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 100MHz): 26,12 (CHCH₂CH₂); 29,89 (CHCH₂CH₂); 30,96 (NCH₃); 57,55 (CHCH₂CH₂); 113,28 (ArMMT); 116,12 (CN); 129,04 (ArMMT); 133,38 (ArMMT); 158,63 (CONH); 159,04 (ArMMT); 173,91 (CO₂H); 177,48 (CO₂H)

MS-EI m/z (%): 333 (1, M⁺); 307 (1, [M⁺-CN]); 130 (2, [CNArN₂]⁺); 102 (6, [CNAr]⁺); 84 (13, [CO(CH₂)₂CH=NH]⁺)

Ácido [1-(4-bromofenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-L-glutâmico (49b)

IV $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3358 (OH); 1709 (CONH)

^1H -RMN $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 400MHz): 2,08 (1H, m, CHCH₂CH₂); 2,41 (1H, m, CHCH₂CH₂); 2,51 (2H, m, CHCH₂CH₂); 3,05 (3H, s, NCH₃); 4,17 (1H, q, $J=3,6$ Hz, CHCH₂CH₂); 8,04-8,56 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz, ArMMT)

^{13}C -RMN $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 100MHz): 26,02 (CHCH₂CH₂); 27,92 (CHCH₂CH₂); 30,18 (NCH₃); 57,89 (CHCH₂CH₂); 129,96 (ArMMT); 159,08 (CONH); 173,81 (CO₂H); 177,57 (CO₂H)

MS-EI m/z (%): 185 (9, [BrArN₂]⁺); 183 (8, [BrArN₂]⁺); 174 (27, [M-BrArMMT]⁺); 157 (13, [BrAr]⁺); 155 (13, [BrAr]⁺); 84 (100, [CO(CH₂)₂CH=NH]⁺)

Ácido [1-(4-toluil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-L-glutâmico (49c)

IV $\nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3423 (OH); 1706 (CONH)

^1H -RMN $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl₃, 400MHz): 2,05 (1H, m, $J=7,6$ Hz, CHCH₂CH₂); 2,36 (1H, m, CHCH₂CH₂); 2,45 (2H, m, CHCH₂CH₂); 2,63 (3H, s, CH₃Ar); 3,01 (3H, s, NCH₃); 4,23 (1H, q, $J=3,6$ Hz, CHCH₂CH₂); 7,64-8,56 (4H, AA'XX', $J=8,4$, ArMMT)

$^{13}\text{C-RMN}$ $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ (CDCl_3 , 100MHz): 23,24 (CH_3Ar); 26,16 (CHCH_2CH_2); 27,92 (CHCH_2CH_2); 30,14 (NCH_3); 57,65 (CHCH_2CH_2); 115,1 (ArMMT); 130,01 (ArMMT); 132,5 (ArMMT); 156,92 (ArMMT); 159,33 (CONH); 173,9 (CO_2H); 177,21 (CO_2H)

MS-EI m/z (%): 322 (4, M^+); 307 (1, M^+-15); 119 (41, $[\text{CH}_3\text{ArN}_2]^+$); 91 (22, $[\text{CH}_3\text{Ar}]^+$); 84 (82, $[\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{NH}]^+$)

Ácido [1-(4-acetilfenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-L-glutâmico (49d)

$\text{IV } \nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3362 (OH); 1708 (CONH); 1695 (COCH_3)

$^1\text{H-RMN}$ $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl_3 , 400MHz): 2,08 (1H, m, CHCH_2CH_2); 2,37 (1H, m, CHCH_2CH_2); 2,47 (2H, m, CHCH_2CH_2); 2,72 (3H, s, COCH_3); 3,02 (3H, s, NCH_3); 4,16 (1H, m, CHCH_2CH_2); 8,34-8,81 (4H, AA'XX', $J=8,4$ Hz, ArMMT)

$^{13}\text{C-RMN}$ $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ (CDCl_3 , 100MHz): 27,01 (CHCH_2CH_2); 27,56 (COCH_3); 28,01 (CHCH_2CH_2); 32,05 (NCH_3); 53,79 (CHCH_2CH_2); 130,76 (ArMMT); 133,40 (ArMMT); 160,02 (ArMMT); 173,9 (CO_2H); 177,3 (CO_2H)

MS-EI m/z (%): 147 (3, $[\text{CH}_3\text{COArN}_2]^+$); 120 (3, $[\text{CH}_3\text{COAr}]^+$); 84 (74, $[\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{NH}]^+$)

Ácido [1-(4-etoxicarbonilfenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-L-glutâmico (49e)

$\text{IV } \nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3401 (OH); 1718 (CONH); 1157 ($\text{OCOCH}_2\text{CH}_3$)

$^1\text{H-RMN}$ $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl_3 , 400MHz): 1,92 (1H, m, $J=7,6$ Hz, CHCH_2CH_2); 2,15 (1H, m, CHCH_2CH_2); 2,40 (2H, m, CHCH_2CH_2); 3,04 (3H, s, NCH_3); 4,26 (1H, q, $J=4,4$ Hz, CHCH_2CH_2); 4,47 (2H, q, $J=7,2$ Hz, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$); 8,43-8,82 (4H, AA'XX', $J=8,4$ Hz, ArMMT)

MS-EI m/z (%): 177 (4, $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOArN}_2]^+$); 149 (12, $[\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOAr}]^+$); 84 (64, $[\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{NH}]^+$)

Ácido [1-(4-aminocarbonilfenil)-3-metiltriazenil]-carbamoil-L-glutâmico (49f)

$\text{IV } \nu_{\text{máx}}/\text{cm}^{-1}$: 3401 (OH); 3447 (NH_2CO); 1721 (CONH); 1673 (CONH_2)

$^1\text{H-RMN}$ $\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (CDCl_3 , 400MHz): 1,96 (1H, m, CHCH_2CH_2); 2,04 (1H, m, CHCH_2CH_2); 2,37 (2H, m, CHCH_2CH_2); 2,94 (3H, s, NCH_3); 4,14 (1H, q, CHCH_2CH_2); 6,19 (1H, s alargado, CONH_2); 8,29-8,76 (4H, AA'XX', $J=8,8$ Hz, ArMMT)

$^{13}\text{C-RMN}$ $\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ (CDCl_3 , 100MHz): 24,59 (CHCH_2CH_2); 27,99 (CHCH_2CH_2); 34,89 (NCH_3); 53,24 (CHCH_2CH_2); 119,76 (ArMMT); 127,40 (ArMMT); 128,9 (ArMMT); 168,9 (CONH_2)

MS-EI m/z (%): 148 (7, $[\text{NH}_2\text{COArN}_2]^+$); 120 (66, $[\text{NH}_2\text{COAr}]^+$); 84 (100, $[\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CH}=\text{NH}]^+$)

4.7 Estudos Cinéticos

Os estudos cinéticos foram realizados em tampões aquosos e usando espectroscopia de UV ou HPLC.

4.7.1 Espectroscopia de Ultra-Violeta

Numa célula de quartzo contendo 3ml de tampão fosfato isotónico (0,01 M, pH 7.4), previamente termostatada a 25°C, juntou-se uma alíquota (30 µl) de solução de substrato 10^{-5} M. Os espectros de absorção foram obtidos num intervalo de λ entre os 200 e os 400nm. O mesmo procedimento foi utilizado, mas para células contendo tampão fosfato termostatadas a 37°C. Para valores de pH > 7, o c.d.o. a que se seguiu o decréscimo de absorção no UV corresponde ao que originou a maior diferença de absorvância entre o princípio e o fim da reacção (figura 4.1). As reacções foram seguidas até à infinidade.

Calcularam-se as constantes de velocidade de pseudo 1ª ordem a partir da equação 4.1:

$$\text{---} \quad (4.1)$$

onde Abs_0 , Abs_t e Abs_∞ , são respectivos aos valores de absorção no tempo t_0 , t e t_∞ .

Construindo o gráfico de $\ln (Abs_t - Abs_\infty)$ contra o tempo, obtiveram-se rectas cujos declives são as constantes de velocidade observadas (k_{obs}). Na figura 4.2 é possível observar um exemplo desta representação gráfica para o composto **49d**.

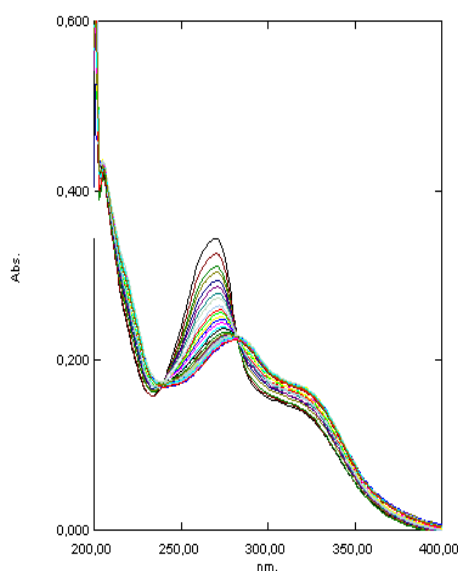


Figura 4.1 – Decomposição do composto **49d** em tampão fosfato pH 7.4 a 37°C.

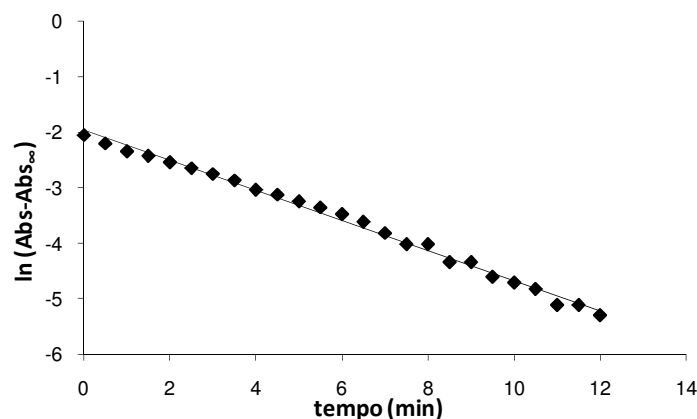


Figura 4.2 – Gráfico obtido para determinação do k_{obs} da hidrólise do **49d**, em tampão fosfato pH 7.4, a 25°C, utilizando os dados da tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Variação da absorbância ao longo do tempo na hidrólise do composto **49d** em tampão fosfato; pH = 7.4; T = 25°C; λ = 270nm.

tempo (min)	Abs_t	$Abs_t - Abs_\infty$	$\ln(Abs_t - Abs_\infty)$
0	0,344	0,129	-2,0479
0,5	0,326	0,111	-2,1982
1	0,311	0,096	-2,3434
1,5	0,304	0,089	-2,4191
2	0,294	0,079	-2,5383
2,5	0,286	0,071	-2,6451
3	0,279	0,064	-2,7489
3,5	0,272	0,057	-2,8647
4	0,263	0,048	-3,0366
4,5	0,259	0,044	-3,1236
5	0,254	0,039	-3,2442
5,5	0,25	0,035	-3,3524
6	0,246	0,031	-3,4738
6,5	0,242	0,027	-3,6119
7	0,237	0,022	-3,8167
7,5	0,233	0,018	-4,0174
8	0,233	0,018	-4,0174
8,5	0,228	0,013	-4,3428
9	0,228	0,013	-4,3428
9,5	0,225	0,01	-4,6052
10	0,224	0,009	-4,7105
10,5	0,223	0,008	-4,8283
11	0,221	0,006	-5,1160
11,5	0,221	0,006	-5,1160
12	0,22	0,005	-5,2983
12,5	0,218	0,003	-5,8091
13	0,217	0,002	-6,2146
13,5	0,218	0,003	-5,8091
14	0,216	0,001	-6,9078
14,5	∞	-----	-----

Os valores do tempo de semi-vida, ou seja, o tempo necessário para que a concentração do composto se reduza a metade, foram calculados a partir da equação 4.2:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{\text{obs}}} \quad (4.2)$$

4.7.2 Cromatografia Líquida de Alta Resolução

No estudo de estabilidade dos compostos em tampão fosfato isotónico (0,01 M, pH 7.4) feito por HPLC utilizou-se um método descontínuo em que várias amostras da mistura reaccional foram analisadas ao longo do tempo. A solução tampão (3 ml) foi colocada num frasco de reacção em banho de água previamente termostatado a 37°C. Aguardados cerca de 15min, adicionaram-se 150 µl de uma solução *stock* de substrato (10^{-2} M) em acetonitrilo. No tempo zero retirou-se imediatamente uma alíquota de 50 µl e, posteriormente, em tempos regulares, retiraram-se alíquotas de 50 µl que foram injectadas e analisadas pelo sistema de HPLC. Dependendo do composto em estudo, o eluente variava nas proporções de fase aquosa (Hidrogenofosfato de tetrabutílamónio, 0,001 M) e de fase orgânica (Acetonitrilo). O comprimento de onda utilizado para cada composto foi o determinado anteriormente nos ensaios de espectroscopia de UV. Os ensaios foram realizados em duplicado.

Os produtos resultantes foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos correspondentes amina e MMT (tabela 4.4). Na figura 4.3 pode ver-se uma sequência de cromatogramas que permitiram seguir a reacção.

Tabela 4.4 – Valores dos tempos de retenção e condições utilizadas nos ensaios de HPLC dos pró-fármacos (49) e respectivos MMT e amina em tampão fosfato isotónico pH 7.4, a 37°C.

49	Produto	t_r	Condições
a	Amina	2,067	40 ACN : 60 TBAH
	MMT	2,4	
	PFD	1,087	
b	Amina	1,5	55 ACN : 45 TBAH
	MMT	2,483	
	PFD	3,967	
c	Amina	1,117	50 ACN : 50 TBAH
	MMT	1,717	
	PFD	2,723	
e	Amina	3,393	40 ACN : 60 TBAH
	MMT	3,527	
	PFD	0,973	

Nota: O fluxo aplicado em todos os ensaios foi de 1ml/min.

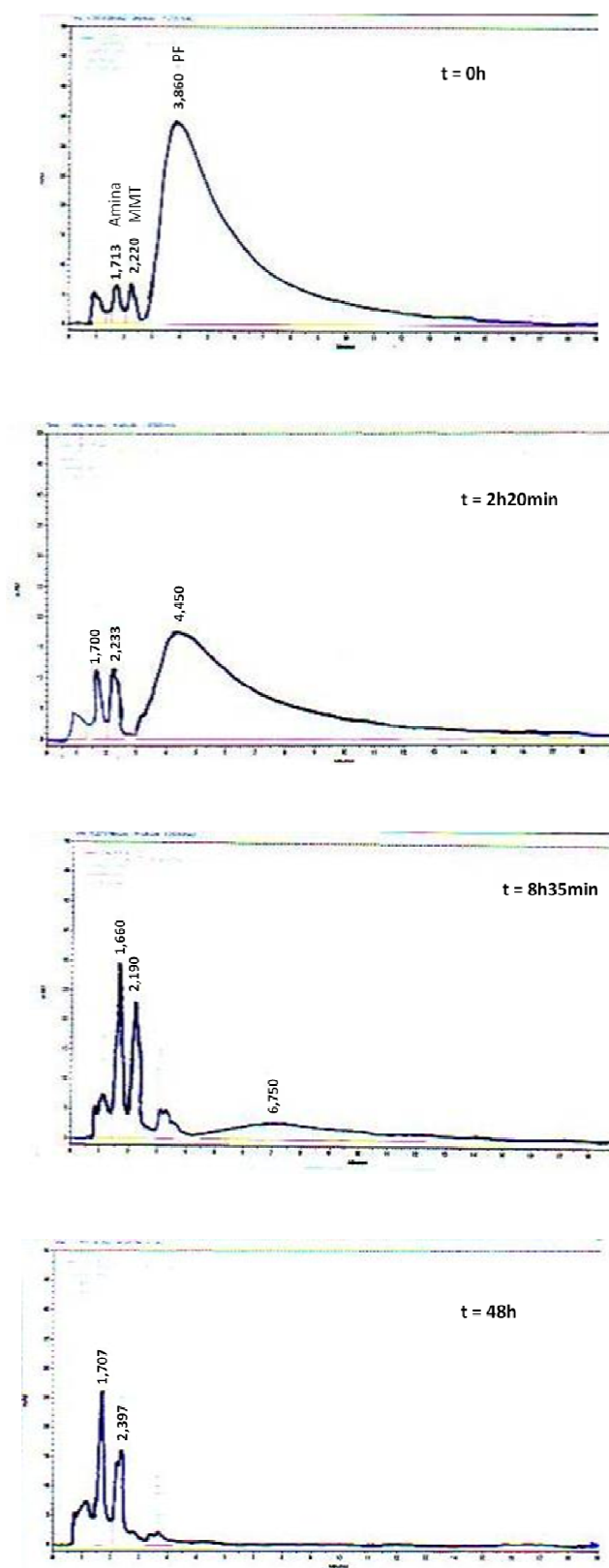


Figura 4.3 – Sequência de cromatogramas de HPLC da reacção de hidrólise do substrato **49c** e respectivos padrões em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C.

Todas as reacções mostraram cinéticas de pseudo 1ª ordem e foram seguidas até pelo menos 3 semi-vidas. Os valores de k_{obs} foram obtidos a partir do declive dos gráficos do logaritmo da área ($\ln(\text{área})$) em função do tempo (figura 4.4). Os respectivos tempos de semi-vida calcularam-se por recurso à equação 4.2.

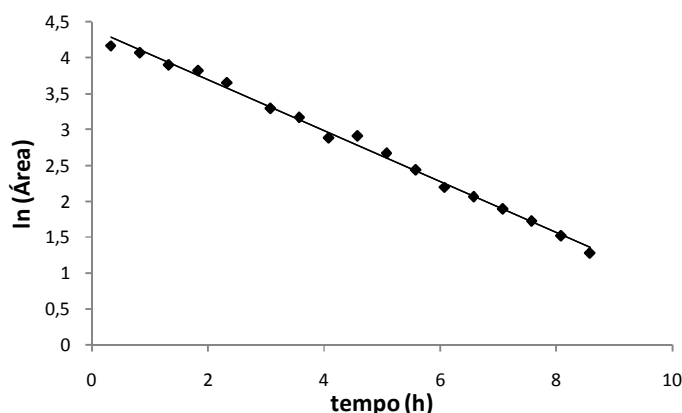


Figura 4.4 – Gráfico utilizado na determinação do coeficiente de velocidade de hidrólise do composto **49c** em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, seguida por HPLC a 278nm.

4.7.3 Estudos de Hidrólise em Plasma Humano

4.7.3.1 Obtenção de Plasma Humano

O plasma utilizado nestes estudos foi obtido a partir do sangue de vários indivíduos saudáveis e foi recolhido em tubos com heparinato de sódio. Depois de centrifugado, todo o plasma sobrenadante foi dividido por vários frascos de vidro em fracções de 2 ml, que foram conservados a -18°C. Antes de cada utilização procedeu-se ao descongelamento gradual do plasma, de forma a evitar a desnaturação das proteínas plasmáticas.

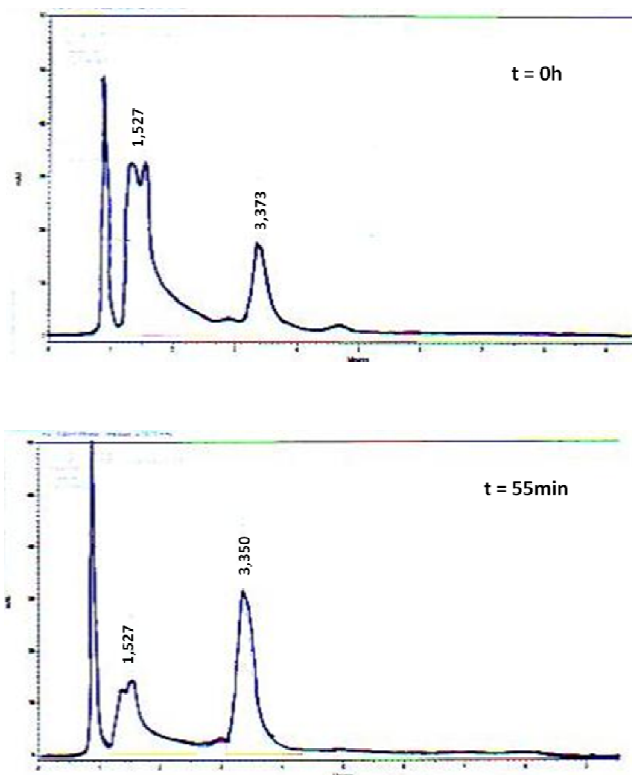
4.7.3.2 Estudos Cinéticos em Plasma

A hidrólise dos substratos foi realizada em plasma humano diluído em tampão fosfato isotónico (0,01 M, pH 7.4). Inicialmente utilizou-se plasma diluído a 80% (2 ml de plasma em 0,5 ml de tampão) e numa fase final, plasma diluído a 20% (0,5 ml de plasma em 2 ml de tampão). Esta mistura foi colocada num banho previamente termostatado a 37°C. Após estabilização da temperatura, adicionou-se uma alíquota (12,5 μ l) de solução *stock* de substrato a 10^{-2} M. Em intervalos de tempo regulares, começando no tempo zero, retiraram-se amostras de 200 μ l da mistura reaccional que se injectaram em *ependorfs* contendo 400 μ l de acetonitrilo, para desproteinização das proteínas do plasma. Após agitação momentânea dos

eppendorfs no vortex, fez-se uma centrifugação a 13000 r.p.m. durante 5 minutos. Retirou-se cuidadosamente o sobrenadante resultante da centrifugação, injectando-o no cromatógrafo, para ser analisado por HPLC. O comprimento de onda utilizado para cada composto foi o determinado anteriormente nos ensaios de espectroscopia de UV.

4.7.4 Estudos de Hidrólise em Albumina Humana

Nestes estudos substituiu-se o plasma pela albumina humana. Utilizaram-se soluções de albumina em tampão fosfato isotónico (0,01 M, pH 7.4) com diferentes concentrações (5×10^{-7} – 5×10^{-5} M) e a metodologia aplicada foi idêntica à descrita nos estudos cinéticos em plasma humano. As alíquotas retiradas que não foram imediatamente injectadas no cromatógrafo ficavam conservadas a -20°C . Todas as reacção seguiram cinéticas de pseudo 1ª ordem, tendo-se determinado os valores de k_{obs} a partir de gráficos do logaritmo da área em função do tempo. Os ensaios foram realizados em duplicado. Na figura 4.5 apresenta-se uma sequência de cromatogramas que permitiram seguir a reacção de hidrólise na presença de albumina humana e na figura 4.6, um gráfico exemplar dos resultados dessa hidrólise obtidos para o composto **49e**.



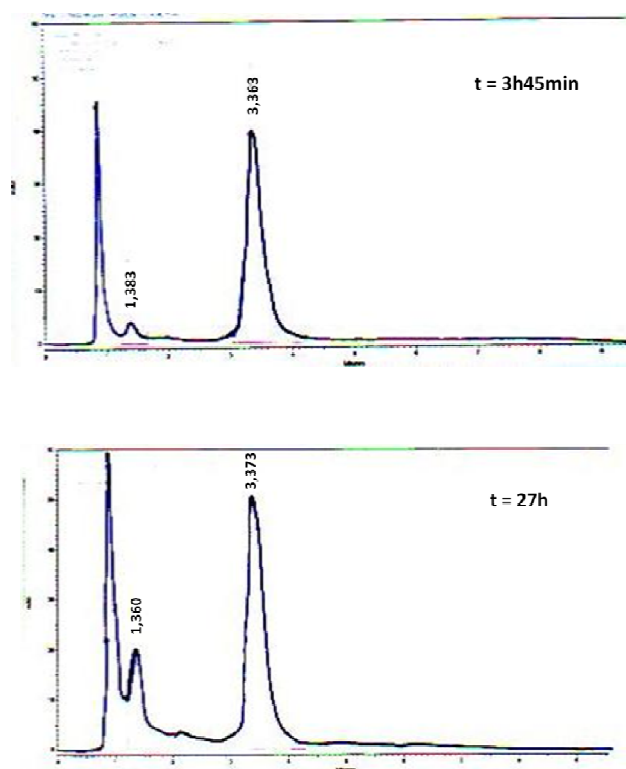


Figura 4.5 – Sequência de cromatogramas de HPLC da reação de hidrólise do substrato **49e** e respectivos padrões em albumina humana, a 37°C.

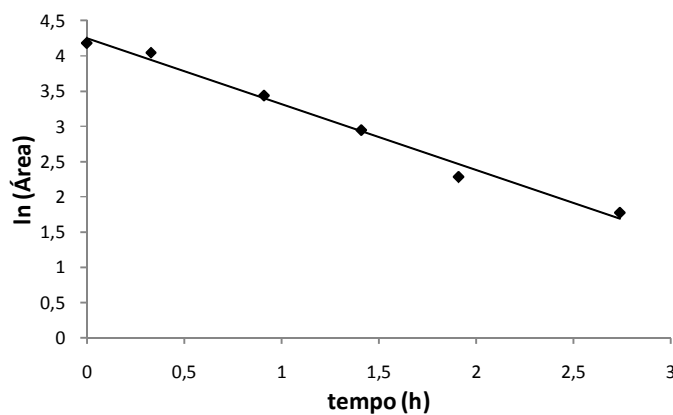


Figura 4.6 - Gráfico utilizado na determinação do coeficiente de velocidade de hidrólise do composto **49e** em albumina humana, a 37°C, seguida por HPLC a 280nm.

4.7.5 Estudos de Hidrólise na Presença da Enzima CarboxiPeptidase

G2

À célula espectrofotométrica (1 ml) contendo tampão Tris-HCl (0,001 M, pH 7.3), previamente termostatada a 37°C, adicionou-se o substrato (10 μ l, 10^{-2} M) e traçou-se um espectro de absorvância entre os 200 e os 400 nm. O mesmo procedimento foi realizado, mas

com uma temperatura de 30°C. O c.d.o. relativo à maior diferença de absorvância entre o potencial pró-fármaco e o correspondente fármaco foi definido e utilizado para os posteriores estudos cinéticos. De seguida, iniciou-se a reacção do substrato com soluções de diferentes concentrações de CPG2 (0,005 – 0,06 U/ml) em Tris-HCl (0,1M, pH 7.3) e ZnCl_2 (260 μM). Para isso, colocou-se a célula contendo tampão Tris-HCl/ ZnCl_2 (0,001 M) e enzima a termostatar a 30°C e, estabilizada a temperatura, adicionou-se o substrato (10 μl , 10^{-2} M). A reacção foi seguida por espectroscopia de UV até à infinidade. Posteriormente, de forma a determinar os valores de K_m e $V_{\text{máx}}$, testaram-se diferentes concentrações de substrato (1 – 10 μM) frente à enzima, cuja concentração se manteve constante em todos os ensaios. Todos os ensaios foram realizados em duplicado. As velocidades (V) foram determinadas pelo declive da recta da fase inicial de reacção (primeiros 5 minutos) do decréscimo da concentração de substrato em função do tempo. As constantes catalíticas foram determinadas através de uma regressão não-linear de Michaelis-Menten, por recurso ao programa Graphpad Prism 5, Graphpad Software Inc. A cinética enzimática dos compostos **49** segue um comportamento como o observado na figura 4.7 e representa-se, matematicamente, pela equação 4.3.

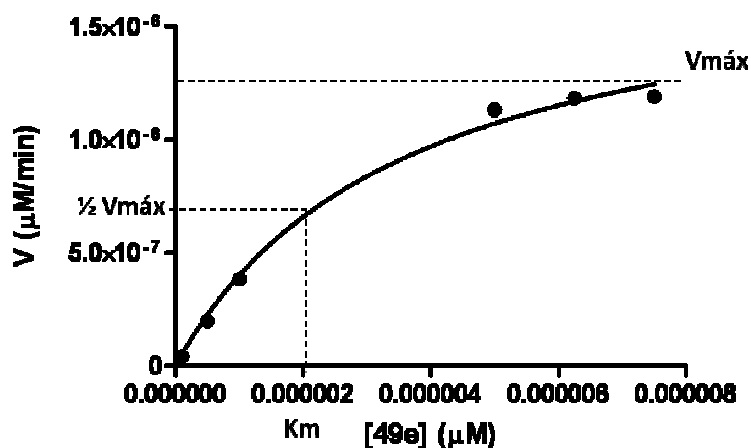


Figura 4.7 – Representação gráfica da regressão não-linear de Michaelis-Menten para determinação do K_m e do $V_{\text{máx}}$ resultante da hidrólise do composto **49e** na presença da CPG2, a 30°C.

$$\text{---} \quad (4.3)$$

Referências

Bibliográficas

1. Sharma, D.; Reisfeld, R. A.; Becker, J. C.; Antibody targeted drugs as cancer therapeutics, *Nature Reviews – Drug Discovery*, **2006**, 5: 147-159.
2. Tietze, L. F.; Feuerstein, T.; Enzyme and proton-activated prodrugs for a selective cancer therapy, *Current Pharmacological Design*, **2003**, 9: 2155-2175.
3. Chabner, B. A.; Roberts Jr, T. G.; Chemotherapy and the war of cancer, *Nature Reviews – Cancer*, **2005**, 5: 65-72.
4. Lodish, A. F.; Molecular cell biology, W. H. Freeman and Company, 5th ed., **2004**.
5. Neidle, S.; Thurston, D. E.; Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies, *Natura Reviews – Cancer*, **2005**, 5: 285-296.
6. Patrick, G. L.; An introduction to medicinal chemistry 3rd ed., Oxford, **2005**, Oxford University Press, New York.
7. Chari, R. V. J.; Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs, *Accounts of Chemical Research*, **2008**, 41: 98-107.
8. Bagshawe, K. D.; Antibody directed enzyme prodrug therapy for cancer: its theoretical basis and application, *Molecular Medicine Today*, **1995**, 424:431.
9. Xu, G.; McLeod, H. L.; Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy, *Clinical Cancer Research*, **2001**, 7: 3314-3324.
10. Denny, D. A.; Prodrug strategies in cancer therapy, *Eur. J. Med. Chem.*, **2001**, 36: 577-595.
11. Denny, W. A.; Tumor-activated prodrugs – A new approach to cancer therapy, *Cancer Investigation*, **2004**, 22: 604-619.
12. Kratz, F.; Müller, I. A.; Ryppa, C.; Warnecke, A.; Prodrug strategies in anticancer chemotherapy, *Chem. Med. Chem.*, **2007**, 1-35.
13. Silverman, R. B.; The organic chemistry of drug design and action, **1992**, Academic Press, Inc.
14. Senter, P. D.; Springer, C. J.; Selective activation of anticancer prodrugs by monoclonal-antibody-enzyme conjugates, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, 53: 247-264.
15. Niculescu-Duvaz, I.; Springer, C. J.; Antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a review, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1997**, 26: 151-172.
16. Bagshawe, K. D.; Antibody directed enzymes revive anti-cancer prodrugs concept, *Br. J. Cancer*, **1987**, 56: 531-532.
17. Bagshawe, K. D.; Springer, C. J.; Searle, F.; Antoniow, P.; Sharma, S. K.; Melton, R. G.; Sherwood, R. F.; A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites, *Br. J. Cancer*, **1988**, 58: 700-703.
18. Bagshawe, K. D.; Burke, P. J.; Knox, R. J.; Melton, R. G.; Sharma, S. K.; Targeting enzymes to cancers – new developments, *Exp. Opin. Invest. Drugs*, **1999**, 8: 161-172.
19. Krishna, D. H.; Rao, A. R. R.; Krishna, D. R.; Selective activation of anthracycline prodrugs for use in conjunction with ADEPT, *Drug News Perspect*, **2003**, 16: 309-318.
20. Weerapreeyakul, N.; Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT), *KKU Sci. J.*, **2002**, 30: 88-98.
21. Dowell, R. I.; Springer, C. J.; Davies, D. H.; Hadley, E. M.; Burke, P. J.; Boyle, F. T.; Melton, R. G.; Connors, T. A.; Blakey, D. C.; Mauger, A. B.; New mustard prodrugs for antibody-directed enzyme prodrug therapy: alternatives to amide link, *J. Med. Chem.*, **1996**, 39: 1100-1105.
22. Denny, W. A.; Prodrugs for gene-directed enzyme-prodrug therapy (suicide gene therapy), *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, **2003**, 1: 48-70.
23. Hedley, D.; Ogilvie, L.; Springer, C.; Carboxypeptidase G2-based gene-directed enzyme-prodrug therapy: a new weapon in the GDEPT armoury, *Nature Reviews – Cancer*, **2007**, 7: 870-879.
24. Friedlos, F.; Davies, L.; Scanlon, I.; Ogilvie, L. M.; Martin, J.; Stribbling, S. M.; Spooner, R. A.; Niculescu-Duvaz, I.; Marais, R.; Springer, C. J.; Three new prodrugs for suicide gene therapy using carboxypeptidase G2 elicit bystander efficacy in two xenograft models, *Cancer Research*, **2002**, 62: 1724-1729.
25. Altaner, C.; Prodrug cancer gene therapy, *Cancer Letters*, **2008**, 270: 191-201.

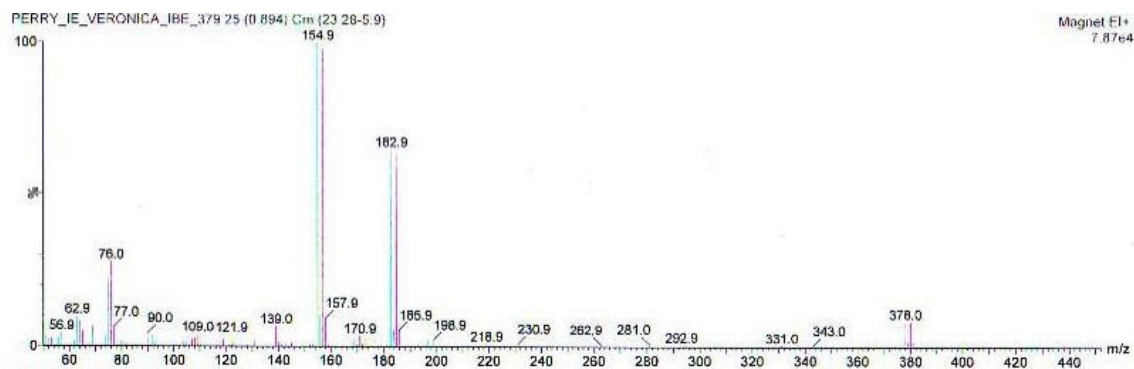
26. Perry, M. J.; Mendes, E.; Simplicio, A. L.; Coelho, A.; Soares, R. V.; Iley, J.; Moreira, R.; Francisco, A. P.; Dopamine- and tyramine-based derivatives of triazenes: activation by tyrosinase and implications of prodrug design, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44: 3228-3234.
27. Knaggs, S.; Malkin, H.; Osborn, H. M. I.; Williams, N. A. O.; Yaqoob, P.; New prodrugs derived from 6-aminodopamine and 4-aminophenol as candidates for melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT), *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, 3: 4002-4010.
28. Bakley, D. C.; Valcaccia, B. E.; East, S.; Wright, A. F.; Boyle, F. T.; Springer, C. J.; Burke, P. J.; Melton, R. G.; Bagshawe, K. D.; Antitumor effects of an antibody-carboxypeptidase G2 conjugate in combination with a benzoic acid mustard prodrug, *Cell Biophysics*, **1993**, 22: 1-8.
29. Jordan, A. M.; Khan, T. H.; Osborn, H. M. I.; Photiou, A.; Riley, P. A.; Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of a targeted treatment of malignant melanoma, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **1999**, 7: 1775-1780.
30. Stachi, R.; Connores, T. A.; Duncan, R.; PDEPT: polymer-directed enzyme prodrug therapy, *British Journal of Cancer*, **2001**, 85: 1070-1076.
31. Wentworth, P.; Datta, A.; Blakey, D.; Boyle, T.; Partridge, L. J.; Toward antibody-directed "abzyme" prodrug therapy, ADAPT: Carbamate prodrug activation by a catalytic antibody and its in vitro application to human tumor cell killing, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, 93: 799-803.
32. Bagshawe, K. D.; Targeting: the ADEPT story so far, *Current Drug Targets*, **2009**, 10: 152-157.
33. Jung, M.; Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) and related approaches for anticancer therapy, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **2001**, 1: 399-407.
34. Bagshawe, K. D.; Sharma, S. K.; Springer, C. J.; Rogers, G. T.; Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): A review of some theoretical, experimental and clinical aspects, *Annals of Oncology*, **1994**, 5: 879-891.
35. Deonarain, M. P.; Epenetos, A. A.; Targeting enzymes for cancer therapy: old enzymes in new roles, *Br. J. Cancer*, **1994**, 70: 786-794.
36. Rowsell, S.; Paupit, R. A.; Tucker, A. D.; Melton, R. G.; Blow, D. M.; Brick, P.; Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy, *Structure*, **1997**, 5: 337-347.
37. Springer, C. J.; Bagshawe, K. D.; Sharma, S. K.; Searle, F.; Boden, A.; Antoniwi, P.; Burke, P. J.; Rogers, G. T.; Sherwood, R. F.; Melton, R. G.; Ablation of human choriocarcinoma xenografts in nude mice by antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) with three novel compounds, *Eur. J. Can.*, **1991**, 27: 1361-1366.
38. Sharma, S. K.; Boden, J. A.; Springer, C. J.; Burke, P. J.; Bagshawe, K. D.; Rogers, G. T.; Antibody directed enzyme prodrug therapy (ADEPT): a three phase system in ovarian tumor xenografts. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **1994**, 24: 219-228.
39. Napier, M. P.; Sharma, S. K.; Springer, C. J.; Bagshawe, K. D.; Green, A. J.; Martin, J.; Stribbling, S. M.; Cushen, N.; O'Malley, D.; Begent, R. H. J.; Antibody-directed enzyme prodrug therapy: efficacy and mechanism of action in colorectal carcinoma, *Clinical Cancer Research*, **2000**, 6: 765-772.
40. Burke, P. J.; Alkylating agent prodrugs for ADEPT, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1996**, 22: 331-340.
41. Bagshawe, K. D.; Towards generating cytotoxic agents at cancer sites, *Br. J. Cancer*, **1989**, 60: 275-281.
42. Springer, C. J.; Antoniwi, P.; Bagshawe, K. D.; Searle, F.; Bisset, G. M. F.; Jerman, M.; Novel prodrugs which are activated by cytotoxic alkylating agents by carboxypeptidase G2, *J. Med. Chem.*, **1990**, 33: 677-681.
43. Springer, C. J.; Dowell, R.; Burke, P. J.; Hadley, E.; Davies, D. H.; Bakley, D. C.; Melton, R. G.; Niculescu-Duvaz, I.; Optimization of alkylating agent prodrugs derived from phenol and aniline mustards: a new clinical candidate prodrug (ZD2767) for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT), *J. Med. Chem.*, **1995**, 38: 5051-5065.

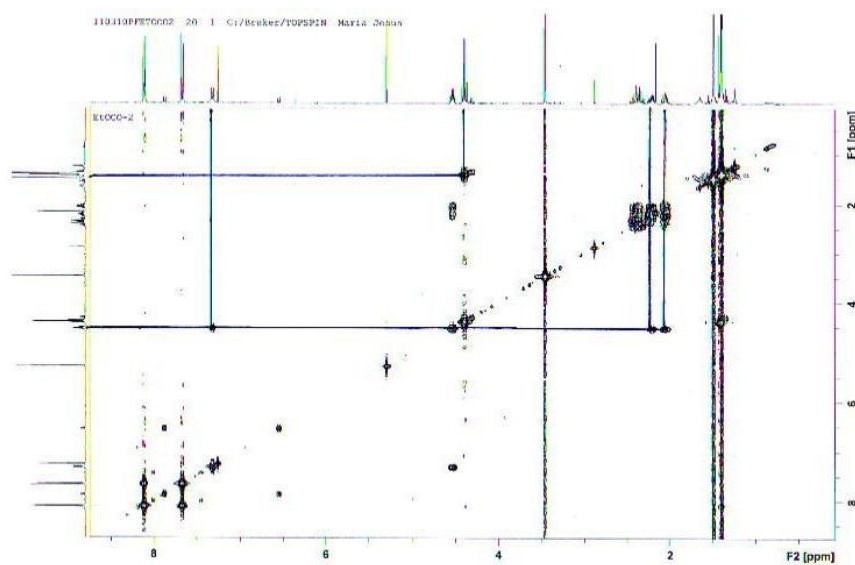
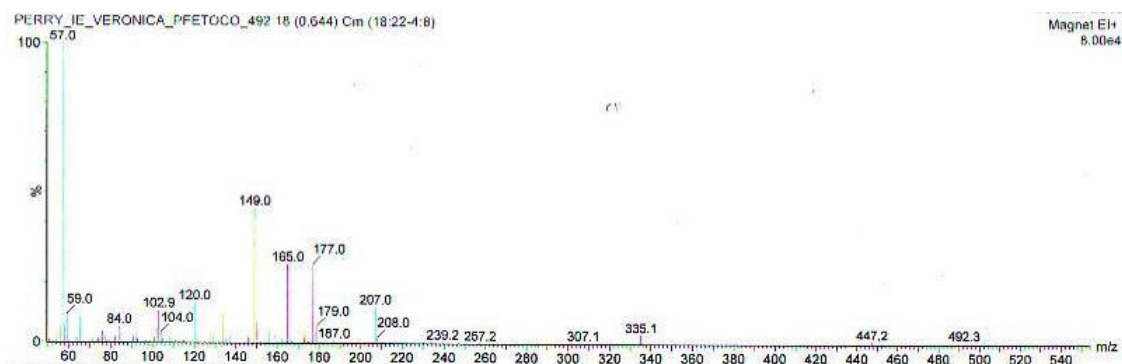
44. Bakley, D. C.; Burke, P. J.; Davies, D. H.; Dowell, R. I.; East, S. J.; Eckersley, K. P.; Fitton, J. E.; McDaid, J.; Melton, R. G.; Niculescu-Duvaz, I. A.; Pinder, P. E.; Sharma, S. K.; Wright, A. F.; Springer, C. J.; ZD2767, an improved system for antibody-directed enzyme prodrug therapy that results in tumor regressions in colorectal tumor xenografts, *Cancer Research*, **1996**, 56: 3287-3292.
45. Monks, N. R.; Blakey, D. C.; Curtin, N. J.; East, S. J.; Heuze, A.; Newell, D. R.; Induction of apoptosis by the ADEPT agent ZD2767: comparison with the classical nitrogen mustard chlorambucil and a monofunctional ZD2767 analogue, *British Journal of Cancer*, **2001**, 85: 764-771.
46. Niculescu-Duvaz, D.; Niculescu-Duvaz, I.; Friedlos, F.; Martin, J.; Lehouritis, P.; Marais, R.; Springer, C. J.; Self-immolative nitrogen mustards prodrugs cleavable by carboxypeptidase G2 (CPG2) showing large cytotoxicity differentials in GDEPT, *J. Med. Chem.*, **2003**, 46: 1690-1705.
47. Connors, T. A.; Goddard, P. M.; Meral, K.; Ross, W. C. J.; Wilman, D. F. V.; Tumor inhibitory triazenes: structural requirements for an active metabolite, *Biochemical Pharmacology*, **1976**, 25: 241-246.
48. Rosa, E.; Carvalho, E.; Cheng, S. C.; Fernandes, L.; Iley, J.; Moreira, R.; Nunes, A.; Ruecroft, G.; Triazenos antitumorais: mecanismo de acção biológica e desenvolvimento de pró-fármacos, *Separata da Revista Portuguesa de Farmácia*, **1992**, XLI: 7-14.
49. Nifontov, V. I.; Bel'skaya, N. P.; Shtokareva, E. A.; Methods of synthesis and technology of drug: manufacture methods of synthesizing triazenes, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **1993**, 27: 40-49.
50. Marchesi, F.; Turriziani, M.; Tortorelli, G.; Avvisati, G.; Torino, F.; De Vecchis, L.; Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems, *Pharmacological Research*, **2007**, 56: 275-287.
51. Skibba, J. L.; Beal, D. D.; Ramirez, G.; Bryan, G. T.; N-demethylation of antineoplastic agent 4(5)-(3,3-dimethyl-1-triazene)imidazole-5(4)-carboxamide by rats and man, *Cancer Research*, **1970**, 30: 147-150.
52. Newell, D.; Gescher, A.; Harland, S.; Ross, D.; Rutt, C.; N-methyl antitumor agents, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1987**, 19: 91-102.
53. Pool, B. L.; Microsomal mediated metabolism of dialkylaryltriazenes, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **1979**, 93: 221-231.
54. Foster, B. J.; Newell, D. R.; Carmichael, J.; Harris, A. L.; Grumbell, L. A.; Jones, M.; Goddard, P. M.; Calvert, H. A.; Preclinical, phase I and pharmacokinetic studies with the dimethyl phenyltriazene CB10-277, *Br. J. Cancer*, **1993**, 67: 362-268.
55. Jones, J.; Amino acid and peptide synthesis, *Oxford Chemistry Primers: 7*, **1992**, Oxford University Press, New York.
56. Rondestvedt, C. S.; Davis, S. J.; 1-aryl-3,3-dialkyltriazenes as tumor inhibitors, *J. Org. Chem.*, **1957**, 22: 200-203.
57. Wilman, D. E. V.; Goddard, P. M.; Tumor inhibitory triazenes. 2. Variation of antitumor activity within an homologous series, *J. Med. Chem.*, **1980**, 23: 1052-1054.
58. Hemens, C. M.; Manning, H. W.; Vaughan, K.; LaFrance, R. J.; Tang, Y.; Open-chain nitrogen compounds. Part V. Hydroxymethyltriazenes: synthesis of some new alkyl homologues of the anti-tumor 3-methyl-3-hydroxymethyltriazenes and preparation of the derived acetoxymethyl-, benzoyloxymethyl-, and methoxymethyltriazenes *Can. J. Chem.*, **1984**, 62: 741-754.
59. Iley, J.; Moreira, R.; Rosa, E.; Triazene drug metabolites. Part 4. Kinetics and mechanism of the decomposition of 1-aryl-3-benzoyloxymethyl-3-methyltriazenes in mixed aqueous-organic solvents, *J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, **1987**, 1503-1508.
60. Fernandes, L.; Francisco, A. P.; Iley, J.; Rosa, E.; Triazene drug metabolites. Part 14. Kinetics and mechanism of the acid-catalysed hydrolysis of 3-alkoxymethyl-3-alkyl-1-aryltriazenes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1994**, 2313-2317.
61. Carvalho, E.; Francisco, A. P.; Iley, J.; Rosa, E.; The mechanism of hydrolysis of aryl ether derivatives of 3-hydroxymethyltriazenes, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 2056-2063.
62. Iley, J.; Moreira, R.; Rosa, E.; Triazene drug metabolite. Part 11. Synthesis of S-cysteinyl and related derivatives of N-hydroxymethyltriazenes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1991**, 3241-3244.

63. Carvalho, E.; Iley, J.; Rosa, E.; Triazene drug metabolite. Part 13. The decomposition of 3-acyl-3-alkyl-1-aryltriazenes in aqueous sulfuric acid, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, **1993**, 865-870.
64. Carvalho, E.; Iley, J.; Perry, M. J.; Rosa, E.; Triazene drug metabolite. Part 15. Synthesis and plasma hydrolysis of anticancer triazenes containing amino acid carriers, *Pharmaceutical Research*, **1998**, 15: 931-935.
65. Carvalho, E.; Iley, J.; Perry, M. J.; Rosa, E.; Triazene drug metabolite. Part 16. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of aminoacyltriazenes, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1998**, 2375-2380.
66. Perry, M. J.; Carvalho, E.; Rosa, E.; Iley, J.; Towards an efficient prodrug of the alkylating metabolite monomethyltriazene: synthesis and stability of N-acylamino acid derivatives of triazenes, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44: 1049-1056.
67. Smith, R. H.; Mehl, A. F.; Hicks, A.; Denlinger, C. L.; Krtaz, L.; Andrews, A. W.; Michejda, C. J.; 1,3-dimethyl-3-acyltriazenes: synthesis and chemistry of a novel class of biological methylating agents, *J. Org. Chem.*, **1986**, 3751-3757.
68. Ozment, J. L.; Schmiedekamp, A. M.; Schultz-Merkel, L. A.; Smith, R. H.; Michejda, C. J.; Theoretical analysis of acetyltriazene and the mechanistic implications of its reaction with acid, *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113: 397-405.
69. Carvalho, E.; Francisco, A. P.; Iley, J.; Rosa, E.; Triazene drug metabolite. Part 17. Synthesis and plasma hydrolysis of acyloxymethyl carbamate derivatives of antitumor triazenes, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2000**, 8: 1719-1725.
70. Hambley, T. W.; Is anticancer drug development heading in the right direction?, *Cancer Res.*, **2009**, 69: 1259-1262.
71. Lundt, B. F.; Johansen, N. L.; Vølund, A.; Markussen, J.; Removal of t-butyl and t-butylpxycarbibyl protecting groups with trifluoroacetic acid. Mechanisms, byproduct formation and evaluation of scavengers, *Int. J. Protein Res.*, **1978**, 12: 258-268.
72. Kiso, Y.; U. K.; Nakamura, S.; Ito, K.; Akita, T.; Efficient removal of protecting groups by a "push-pull" mechanism. II. Deprotection of *O*-benzyltyrosine with a thioanisole-trifluoroacetic acid system without *O*-to-*C* rearrangements, *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, 28: 673-676.
73. Yajima, H.; Kanaki, J.; Kitajima, M.; Funakoshi, S.; Studies of peptides. LXXXVI. Application of the trifluoroacetic acid-thioanisole deprotecting procedure for the synthesis of a wasp venom, mastoparan, *Chem. Pharm. Bull.*, **1980**, 28: 1214-1218.
74. Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J.; Spectrometric identification of organic compounds, John Wiley & Sons, Inc., New York, 7th ed., 2005.
75. Krainikova, I. G.; Pen'kovskii, V. V.; Mass-spectrometric and quantum-chemical study of fragmentation of diallyl of dicarboxylic acids, *Theoreticheskaya I Éksperimental'naya Khimiya*, **1990**, 26: 300-307.
76. Grossert, J. S.; Cook, M. C.; White, R. L.; The influence of structural features on facile McLafferty-type, even-electron rearrangements in tandem mass spectra of carboxylate anions, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20: 1511-1516.
77. Kanawati, B.; Schmitt-Kopplin, P.; Exploring rearrangements along the fragmentation of glutaric acid negative ion: a combined experimental and theoretical study, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2010**, 24: 1198-1206.
78. Rocha, M. J. P.; Desenvolvimento de pró-fármacos de triazenos anti-tumorais usando amino-ácidos como transportadores, Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, Lisboa, **2002**.
79. Bertucci, C.; Domenici, E.; Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance, *Current Medicinal Chemistry*, **2002**, 9: 1463-1481.
80. Aarons, L.; Clifton, P.; Fleming, G.; Rowland, M.; Aspirin binding and the effect of albumin on spontaneous and enzyme-catalysed hydrolysis, *J. Pharm. Pharmacol.*, **1980**, 32: 537-543.

81. Burke, T. G.; Munshi, C. B.; Mi, Z.; Jiang, Y.; The important role of albumin in determining the relative human blood stabilities of the camptothecin anticancer drugs, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1995**, 84: 518-519.
82. Niculescu-Duvaz, D.; Niculescu-Duvez, I.; Friedlos, F.; Martin, J.; Spooner, R.; Davies, L.; Marais, R.; Springer, C. J.; Self-immolative nitrogen mustard prodrugs for suicide gene therapy, *J. Med. Chem.*, **1998**, 41: 5297-5309.
83. Antoniwi, P.; Springer, C. J.; Bagshawe, K. D.; Searle, F.; Melton, R. G.; Rogers, G. T.; Burke, P. J.; Sherwood, R. F.; Disposition of the prodrug 4-(bis(2-chloroethyl)amino)benzoyl-L-glutamic acid and its active parent drug in mice, *Br. J. Cancer*, **1990**, 62: 909-914.
84. Fasano, M.; Curry, S.; Terreno, E.; Galliano, M.; Fanali, G.; Narciso, P.; Notari, S.; Ascenzi, P.; The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, *IUBMB Life*, **2005**, 57: 787-796.
85. Shanbhag, V. P.; Johansson, G.; Interaction of human serum albumin with fatty acids, *Eur. J. Biochem.*, **1979**, 93: 363-367.
86. Meijiers, B. K. I.; Bammens, B.; Verbeke, K.; Evenepoel, P.; A review of albumin binding in CDK, *American Journal of Kidney Diseases*, **2008**, 51: 839-850.
87. Kratz, F.; Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, **2008**, 132: 171-183.
88. Delben, F.; Paoletti, S.; Manzini, G.; Nisi, C.; Influence of serum albumins on decomposition rates of *para*-substituted 1-phenyl-3-methyltriazenes and 5-(3-methyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide in near physiological conditions, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **1981**, 70: 892-897.
89. Pandit, N. K.; Introduction to the pharmaceutical sciences, 1st ed., **2007**, Lippincott Williams & Wilkins.
90. <http://www.vclab.org/lab/alogps/>.
91. Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D.; Partition coefficients and their uses, *Chemical Reviews*, **1971**, 71: 525-554.
92. Springer, C. J.; Niculescu-Duvaz, I.; Pedley, R. B.; Novel prodrugs of alkylating agents derived from 2-fluoro- and 3-fluorobenzoic acids for antibody-directed enzyme prodrug therapy, *J. Med. Chem.*, **1994**, 37: 2361-2370.
93. Davies, L. C.; Friedlos, F.; Hedley, D.; Martin, J.; Ogilvie, L. M.; Sacnlon, I. J.; Springer, C. J.; Novel fluorinated prodrugs for activation by carboxypeptidase G2 showing good in vivo antitumor activity in gene-directed enzyme prodrug therapy, *J. Med. Chem.*, **2005**, 48: 5321-5328.
94. Pedley, R. B.; Sharma, S. K.; Hawkins, R. E.; Chester, K. A.; Antibody-directed enzyme-prodrug therapy, *Methods in molecular medicine*, **2003**, 90: 491-514, *Suicide gene-therapy: methods and reviews*, Human Press Inc., Totowa.
95. Levy, C. C.; Goldman, P.; The enzymatic hydrolysis of methotrexate and folic acid, *The Journal of Biological Chemistry*, **1967**, 242: 2933-2938.
96. Enzymatic Assay of Carboxypeptidase G (EC 3.4.19.9).
97. Curriel, D. T.; Douglas, J. T.; *Cancer Gene Therapy*, Contemporary Cancer Research, **2005**, Human Press Inc.
98. Copeland, R. A.; Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: A guide for medicinal chemists and pharmacologists, Wiley-Interscience, **2005**, A John Wiley & Sons, Inc, Publication.
99. Matthews, B. W.; Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases, *Acc. Chem. Res.*, **1988**, 21: 333-340.
100. Fernandes, M. L. S.; Química dos Hidroximetiltriazenos, Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia de Lisboa, Lisboa, **1987**.
101. Cheng, A. C.; Iley, J.; Synthesis of 1-aryl-3-methyltriazenes by base-promoted decomposition of 1-aryl-3-hydroxymethyl-3-methyltriazenes, *J Chem. Research (S)*, **1983**, 320-321.
102. Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced Inorganic Chemistry*, Interscience Publishers, New York, USA, 3rd ed.; 1972.

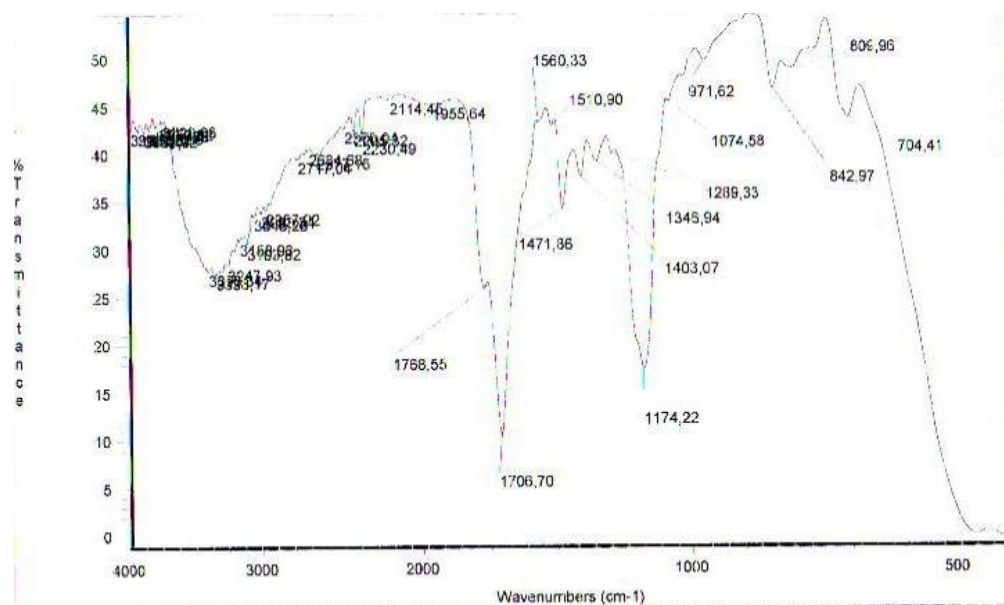
Anexos



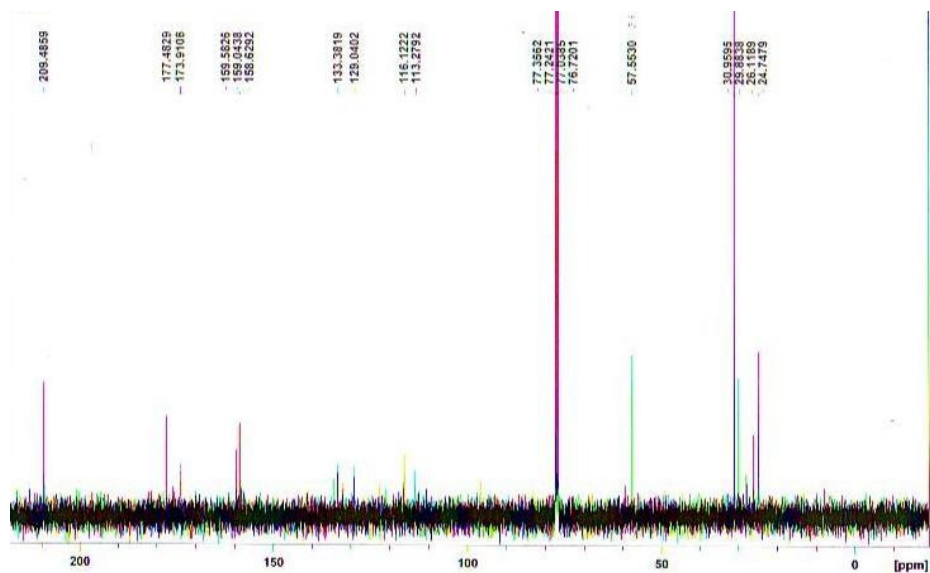
Composto Xe – Espectro de Cosy**Composto Xe – Espectro de Massa**

Derivados Pró-Fármacos

Composto Xa – Espectro de IV



Composto Xa – Espectro de ¹³C



Composto Xc – Espectro de Cosy